

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



Infeção por *Leishmania* spp./Leishmaniose em gatos na Península de Setúbal

Catarina Isabel Lopes Sequeira

ORIENTADORA:

Doutora Isabel Maria Soares
Pereira da Fonseca de Sampaio

TUTORA:

Dra. Cristina Maria dos Santos
Alves

2021

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



Infeção por *Leishmania* spp./Leishmaniose em gatos na Península de Setúbal

Catarina Isabel Lopes Sequeira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI:

PRESIDENTE:

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

VOGAIS:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier Félix
Lourenço

ORIENTADORA:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira
da Fonseca

TUTORA:

Dra. Cristina Maria dos Santos Alves

2021

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Catarina Isabel Lopes Sequeira

Título da Tese ou Dissertação: *Leishmania* spp./ Leishmaniose em gatos na Península de Setúbal

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 15 de Fevereiro de 2021

Designação do curso de Mestrado: Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☐ Clínica

☐ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☒ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

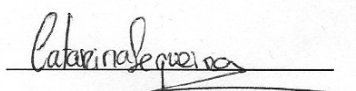
Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

7. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
8. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
9. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 15 de Fevereiro de 2021

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura:



Agradecimentos

À minha orientadora, a Professora Isabel Fonseca, por todo o apoio ao longo deste percurso, pela paciência, simpatia e por estar sempre disponível para todas as minhas dúvidas e para me ajudar em tudo. Agradeço do fundo do coração.

À Dra. Cristina Alves e à equipa do Hospital Veterinário Principal, por me terem recebido para realizar este projeto, por todo o conhecimento transmitido e pela ajuda ao longo do estágio. Obrigada à Ana, Susana mãe (que me batizou de novo) e Susana filha pela ajuda com os seus gatinhos para contribuir para este projeto e pela boa disposição e amizade. Ao Martin, um cão muito especial que levarei para sempre comigo no coração.

A toda a equipa do SOSVet por me terem recebido no estágio extracurricular. Por todos os ensinamentos que me foram transmitidos, pela paciência e prontidão em ajudar mas também pela boa disposição.

À Dra. Lídia Gomes, por me ter recebido da melhor forma no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV, por toda a ajuda, simpatia, boa disposição e pelas nossas trocas de ideias e realização de listas, ressalvo que já atualizei a minha!

Ao Professor Telmo Nunes, por me ter ajudado na elaboração da análise estatística deste trabalho, pela sua disponibilidade e paciência!

Ao Doutor Jacinto Gomes do INIAV pelo diagnóstico molecular e sequenciação das amostras enviadas.

Agradeço aos meus amigos que a Faculdade me deu, Margarida, Sara, Manuela, obrigada pela amizade e por todos os nossos momentos tanto bons, como os pânico antes dos exames, sem vocês não era a mesma coisa! À minha afilhada Joana que me escolheu como Madrinha, por ter sido a melhor afilhada que podia ter, e também por me ter ajudado tanto ao longo deste percurso.

Aos meus amigos de longa data, apesar de menos tempo juntos, nas férias havia sempre um tempinho para contar as novidades, em especial à minha amiga do coração Bea, porque mesmo que a Faculdade nos tenha separado, a amizade continua sempre igual.

Agradeço à minha família, porque sem eles nada disto seria possível, em especial à minha Mãe que é em quem sempre me apoio nos bons e maus momentos, porque é quem me apoia sempre quando algo não corre bem e me consegue animar. Um especial agradecimento, a quem, com muita pena minha, não me pôde ver concluir esta percurso, mas sei que se orgulhariam muito, avós e tia.

À pessoa mais importante, que me apoiou 24h por dia, o meu Paulo, pela tua boa disposição e por me aturares nos momentos mais difíceis, sem ti não tinha conseguido, por me tratares tão bem e por tratares tão bem da Cookie.

Às minhas três “cãopanheiras”, Hyndia, por teres sido a primeiras das três e teres uma energia que nunca acaba, por seres a cadela mais querida e simpática, por ter sido por ti que entrei neste curso. Às tuas filhas, Akira, por ser o maior demónio mas também a mais fofa do mundo e à Cookie, que me adotou e nunca mais me largou, por ter vindo comigo viver para a capital, ser a minha sombra e ser o meu maior amor.

Agradeço ao CIISA, a entidade responsável pelo financiamento do presente projeto (UIDB/00276/2020) (FCT) e ao Projeto EXOTRYPANO - Achieving new frontiers through trypanosomatid exosomes (TEx) FCT - PTDC/CVT-CVT/28908/2017.



Instituto Nacional de
Investigação Agrária e
Veterinária, I.P.

Resumo

A leishmaniose é uma doença parasitária infecciosa zoonótica, causada por um protozoário do género *Leishmania* que é transmitido durante a refeição dos flebótomos fêmeas. Sabe-se que *Leishmania infantum* infeta carnívoros domésticos e selvagens, lagomorfos, roedores, entre outros animais, incluindo o Homem. Os gatos são naturalmente infetados e suscetíveis às espécies de *Leishmania* que afetam cães e humanos, e nos países da bacia do Mediterrâneo a maioria dos casos envolve *L. infantum*.

A Leishmaniose Felina (LFel) é uma doença emergente, contudo, em Portugal, onde a Leishmaniose canina causada por *L. infantum* é endémica, só recentemente têm sido realizados alguns estudos em gatos.

A presente dissertação teve como objetivos investigar a proporção de infeção por *Leishmania* spp./Leishmaniose em gatos na Península de Setúbal tendo as colheitas de sangue sido realizadas em gatos observados no Hospital Veterinário Principal Dra. Cristina Alves, na Charneca da Caparica.

No Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-ULisboa foram analisadas amostras de soro para deteção de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de imunofluorescência indireta e observados esfregaços de sangue para deteção de hemoparasitas. Os resultados obtidos foram associados à história pregressa dos animais, aos sinais clínicos e à análise das respostas obtidas após realização de questionários pelos tutores/cuidadores dos gatos. Num total de 34 gatos, a proporção de animais com anticorpos anti-*Leishmania* spp. foi de 53% (limiar de positividade 1:40) e de 32,4% (limiar de positividade 1:80). Relativamente à presença de outros hemoparasitas, verificou-se que 65% dos gatos estavam infetados com *Mycoplasma* spp., dos quais 8 eram seropositivos a *Leishmania* spp. Foi ainda detetada, através de técnicas moleculares e de sequenciação, a presença de *Hepatozoon felis* num gato. Dos animais com anticorpos anti-*Leishmania* spp., 54,5% eram fêmeas e a média de idade dos gatos positivos foi de 7 anos.

Os resultados obtidos permitiram um melhor conhecimento desta infeção/doença em gatos na Península de Setúbal. Salienta-se ser fundamental que os veterinários que atuem em áreas endémicas estejam cientes da suscetibilidade dos gatos à infeção por *L. infantum*/LFel, de modo a incluírem-nas no diagnóstico diferencial e a proporem medidas preventivas alertando os tutores sobre a importância desta prevenção.

Palavras-chave: *Leishmania*, leishmaniose, gatos, IFI, *Hepatozoon*, *Mycoplasma*

Abstract

Leishmaniosis is a zoonotic infectious parasitic disease, caused by a protozoan of the genus *Leishmania* that is transmitted during the meal of female sandflies. *Leishmania infantum* is known to infect domestic and wild carnivores as well as lagomorphs and rodents, among other animals, including Man. Cats are naturally infected and susceptible to the same species of *Leishmania* that affect dogs and humans. In the countries of the Mediterranean basin most cases involve *L. infantum*.

Feline Leishmaniosis (FeL) is an emerging disease, however, in Portugal, an endemic country for canine leishmaniosis caused by *L. infantum*, only recently studies have been carried out on *Leishmania* infection/FeL.

The present dissertation aimed to investigate the proportion of *Leishmania* spp infection/ Leishmaniosis in cats in the Setúbal Peninsula and blood samples were collected from these animals observed at the Veterinary Hospital Principal Dra. Cristina Alves, in Charneca da Caparica.

At the Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, FMV-ULisboa, serum samples were analyzed for the detection of anti-*Leishmania* antibodies using the indirect immunofluorescence technique and stained blood smears were observed for the detection of hemoparasites. The obtained results were associated with the history of the animals, the clinical signs and the analysis of the responses obtained after the completion of questionnaires by the cat's guardians/caregivers. In a total of 34 cats, the proportion of antibodies anti-*Leishmania* spp. was 53% (cut-off 1:40) and 32.4% (cut-off 1:80). Regarding the presence of other hemoparasites, it was found that 65% of cats were infected with *Mycoplasma* spp., of which 8 were seropositive to *Leishmania* spp. Furthermore, it was possible to detect, through molecular techniques followed by sequencing, the presence of *Hepatozoon felis* in a cat. Of the animals positive to *Leishmania* spp. 54.5% were females and the average age of the positive cats was 7 years.

The results obtained allowed a better knowledge of this infection/disease in cats in the Setúbal Peninsula. It should be emphasized that it is essential that veterinarians who work in endemic areas be aware of the susceptibility of cats to infection by *L. infantum*/FeL, in order to include them in the differential diagnosis list and to recommend preventive measures alerting tutors about the importance of this prevention.

Keywords: *Leishmania*, leishmaniosis, cats, IFI, *Hepatozoon*, *Mycoplasma*

Índice Geral

CAPÍTULO I - RELATÓRIO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO CURRICULAR ..	1
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE A LEISHMANIOSE FELINA (LFEL) E OUTRAS DOENÇAS DO GATO CAUSADAS POR HEMOPARASITAS ..	2
1. Introdução ..	2
2. Leishmaniose felina- LFel ..	3
2.1. Agentes Etiológicos ..	4
2.2. Transmissão ..	6
2.2.1. Hospedeiro Invertebrado – Flebótomos ..	6
2.3. Ciclo de Vida ..	8
2.3.1. Hospedeiro Invertebrado ..	8
2.3.2. Hospedeiro Vertebrado ..	8
2.4. Epidemiologia ..	9
2.5. Patogenia ..	10
2.6. Sinais Clínicos ..	11
2.7. Diagnóstico ..	15
2.7.1. Métodos parasitológicos de observação direta do parasita ..	16
2.7.2. Métodos serológicos para pesquisa de anticorpos ..	16
2.7.3. Métodos moleculares para detecção de ADN de <i>Leishmania</i> ..	17
2.7.4. Exame histopatológico ..	17
2.7.5. Outras técnicas de diagnóstico ..	18
2.7.6. Análises hematológicas e bioquímicas ..	18
2.8. Tratamento ..	18
2.8.1. Análogos das Purinas ..	18
2.8.2. Antimoniato Pentavalente ..	19
Fármaco e Dosagem ..	19
Duração ..	19
2.9. Monitorização e Prognóstico ..	19
2.10. Prevenção ..	20
2.11. Outras doenças parasitárias hemáticas do gato ..	21
2.11.1. Hemoplasmose (Mycoplasmoses) ..	21
2.11.2. Babesiose ..	23
2.11.3. Hepatozoonose ..	24
2.11.4. Dirofilariose/ Achantocheilonemose ..	24
2.11.5. Cytauxzoonose ..	26
CAPÍTULO III- INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i> SPP./LEISHMANIOSE EM GATOS NA PENÍNSULA DE SETÚBAL ..	28
1. Objetivos ..	28
2. Material e métodos ..	28
2.1. Caracterização da Península de Setúbal ..	28
2.2. Caracterização geral da população de gatos em estudo ..	30
2.3. Colheita e conservação de amostras biológicas ..	31
2.4. Métodos de diagnóstico e respetivos protocolos ..	31
2.4.1. Técnica de esfregaço de sangue ..	31
2.4.2. Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) ..	32
2.4.3. Pesquisa de <i>Theileria/Babesia</i> pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) ..	33
2.4.4. Análise estatística ..	33
3. Resultados ..	34
3.1. Caracterização dos animais da amostra ..	34
3.1.1. Localidade onde os gatos habitam ..	34
3.1.2. Meio onde vivem ..	34

3.1.3.Sexo	35
3.1.4.Raça	36
3.1.5.Acesso à rua	36
3.1.6.Resultados IFI	37
3.1.7.Resultados observação de esfregaços	37
3.1.8.Resultados do diagnóstico de <i>Theileria/Babesia</i> por PCR e posterior sequenciação	38
3.1.9.Idade	39
3.1.10.Presença de sinais clínicos e doenças em gatos seropositivos a <i>L.</i> <i>infantum</i>	40
3.1.11.Presença de sinais clínicos compatíveis com LFel	41
3.1.12.Possíveis associações de fatores de risco.....	41
4. Discussão	43
5. Conclusão.....	49
Bibliografia	51
ANEXOS	58

Índice de Gráficos

Gráfico 1- Distribuição dos gatos por localidade (n=34)	34
Gráfico 2- Distribuição dos gatos pelo meio onde vivem (n=34).....	35
Gráfico 3- Distribuição dos gatos por sexo (n=34).....	35
Gráfico 4- Distribuição dos gatos por raça (n=34)	36
Gráfico 5- Distribuição dos gatos por acesso à rua (n=34).....	36
Gráfico 6- Presença de <i>Mycoplasma</i> spp. nos esfregaços de sangue (n=34).....	38
Gráfico 7- Árvore filogenética do gene 18S rRNA gene de sequências de <i>Hepatozoon</i> disponíveis no GenBank®.....	39
Gráfico 8- Distribuição em box-plot da idade dos animais seropositivos e seronegativos (n=32).....	40

Índice de Tabelas

Tabela 1- Frequência de alterações clínicas e laboratoriais descritas na LFel (Adaptado das Guidelines do grupo Leishvet 2018).	13
Tabela 2- Protocolos terapêuticos usados em gatos afetados por LFel. (Adaptado das Guidelines do grupo LeishVet 2018).	19
Tabela 3-Regime de acompanhamento (Adaptado das Guidelines do grupo LeishVet 2018).....	20
Tabela 4- Sinais clínicos presentes nos gatos seropositivos a <i>L. infantum</i> (n=16)	40
Tabela 5- Resultados estatísticos obtidos para os gatos testados.	42

Índice de Figuras

Figura 1- Aspeto da forma promastigota (Foto original de lâmina gentilmente cedida pelo Laboratório de Parasitologia e doenças Parasitárias da FMV)	5
Figura 2 -Aspeto de formas amastigotas livres (seta branca) e no interior de um macrófago (círculo branco). (Foto original de lâmina gentilmente cedida pelo Laboratório de de Parasitologia e doenças Parasitárias da FMV).....	5
Figura 3- Flebótomo macho (Foto original).....	7
Figura 4-Flebótomo fêmea (Foto original).....	7
Figura 5- Distribuição de <i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>P. sergenti</i> e <i>P. ariasi</i> , respetivamente, na Europa, atualizado em Maio de 2020. (acedido em: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/phlebotomus-perniciosus-current-known-distribution-may-2020).....	7
Figura 6- Resumo ilustrativo do ciclo de vida de <i>L. infantum</i> . (Adaptado de Beugnet et al. 2018)	8
Figura 7- Apresentação clínica de LFel: nódulos cutâneos (2-10mm de diâmetro) distribuídos pela face externa da orelha (a) e regiões orbitais (b), apresentando um padrão coalescente. (Basso et al. 2016).....	14
Figura 8- Apresentação clínica de LFel: alopecia simétrica na região externa da orelha e espessamento acral do bordo da orelha esquerda (Pennisi et al. 2015).....	14
Figura 9- Apresentação clínica de LFel: dermatite ulcerativa no membro distal (Pennisi et al. 2015).	14
Figura 10- Apresentação clínica de LFel, uveíte bilateral com hifema na câmara anterior (Pennisi et al. 2015).	14
Figura 11- Apresentação clínica de LFel: estomatite e glossite, envolvendo as margens da língua e a mucosa oral (Pennisi et al. 2015).....	14
Figura 12- Apresentação clínica de LFel: blefarite bilateral com alopecia periocular leve e quemose leve, blefaroespasmo bilateral e presença de pequenos nódulos palpebrais na pálpebra esquerda superior e inferior (seta) (Leal R, et al. 2018).	14
Figura 13- Mapa da Península de Setúbal (adaptado de: https://codigopostal.ciberforma.pt/distrito-de-setubal/).	29
Figura 14- Aspeto de amostra positiva (A) e amostra negativa (B) para <i>L. infantum</i> pela técnica de IFI, na diluição 1:80. (Foto original)	37
Figura 15- Presença de formas de <i>Mycoplasma</i> spp. (setas brancas) nos esfregaços de sangue realizados dos gatos estudados, utilizando coloração Giemsa. (Foto original)	38

Índice de Anexos

ANEXO 1 - Questionário a ser preenchido pelos tutores dos gatos em estudo.	58
ANEXO 2 - Autorização para a colheita de sangue nos gatos presentes no estudo....	62
ANEXO 3 - Tabela com os resultados obtidos através da Técnica de IFI (com limiares de positividade nas diluições de 1:40 e 1:80) destinada à detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	63
ANEXO 4 - Tabela com resultados da presença de <i>Mycoplasma</i> por observação dos esfregaços de sangue.	64
ANEXO 5 - História pregressa dos gatos presentes no estudo.	65
ANEXO 6 - Dados recolhidos através do inquérito realizado aos tutores/cuidadores. .	70

Lista de Siglas e Abreviaturas

ALT- Alanina aminotransferase

APTF- Agente patogénico transmitido por felinos

BID- Do latim *Bis in die*. Duas vezes ao dia. A cada 12h.

CMhm- *Candidatus Mycoplasma haemominutum*

CMt- *Candidatus Mycoplasma turicensis*

ELISA- “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”. Ensaio de imunoabsorção enzimática

FCoV- “Feline Coronavirus”

FeLV- “Feline leukemia virus”- vírus da leucemia felina

FIV- “feline immunodeficiency virus”- vírus da imunodeficiência felina

FMV- Faculdade de Medicina Veterinária

H- Hora

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

IFI- Imunofluorescência indireta

IgG- imunoglobulina G

IM- Intramuscular

INIAV- Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

IU- Unidades internacionais

IV- Intravenosa

Kg- Quilograma

Km- quilómetro

Km²- Quilómetro quadrado

LFel - Leishmaniose felina

Mhf - *Mycoplasma haemofelis*

mL- Mililitro

OIE- World Organization for Animal Health

PCR- “Polymerase Chain Reaction”- Reação de polimerase em cadeia

PO- *per os*

SC- Subcutâneo

SID- Do latim *Semel in die*. Uma vez ao dia. A cada 24h.

TAD- teste de aglutinação direta.

TID- Do latim *Ter in die*. A cada 8h.

WHO- World Health Organization

UPC- rácio urina proteína: creatinina

μL- Microlitro

μm- Micrómetro

°C- Temperatura

CAPÍTULO I - Relatório das atividades desenvolvidas no estágio curricular

O estágio foi realizado no Hospital Veterinário Principal Dra. Cristina Alves, na Charneca da Caparica, no período entre janeiro e março de 2020, num total de 508 horas, tendo sido realizado previamente estágio extracurricular nesse mesmo hospital entre outubro e dezembro de 2019.

O hospital dispõe de 2 consultórios, uma sala de radiologia e ecografia, duas salas de cirurgia e uma área de internamento para cão e para gato, tendo também uma unidade de internamento de infetocontagiosas.

Relativamente aos serviços, dispõe de consultas de pequenos animais, vacinação, radiologia, ecografia, análises clínicas, cirurgia e ortopedia, tendo a aluna tido oportunidade de participar em todas estas áreas.

As atividades realizadas ao longo do estágio a nível de consultas, centraram-se em vacinações e consultas gerais, em que, maioritariamente, era necessário realizar radiografias e/ou ecografias. A aluna auxiliou na sua obtenção, assim como na colheita de sangue destinada a análises clínicas. Dentro das diversas áreas, destacaram-se as consultas de oftalmologia, traumatologia, gastroenterologia, nefrologia, urologia, cardiologia, dermatologia, cirurgia e endocrinologia.

No internamento era responsável por auxiliar na realização de monitorização dos parâmetros clínicos dos animais hospitalizados, preparação e administração de medicação, bem como da alimentação e passeios higiénicos. Para além disso, foi possível realizar vários procedimentos, tais como, cistocenteses, realização de pensos, colocação de cateteres, de sistema de administração de soro e de sondas de algaliação, monitorização de glicémia, medição da pressão arterial e acompanhamento de animais em câmaras de oxigénio, realização de ecografias e de eletrocardiogramas, entre outros.

Nas cirurgias, após a verificação das análises de controlo pré-cirúrgico, auxiliou na colocação do cateter, preparação e colocação do sistema de soro, preparação e administração de medicação pré-anestésica e realização de tricotomia e assépsia da zona cirúrgica. Durante a cirurgia, foram realizadas diversas funções tais como, anestesista em que prestava auxílio na monitorização do plano anestésico e, como assistente de cirurgião.

No que se refere a cirurgias que teve oportunidade de assistir, destacam-se as castrações (cão e gato, macho e fêmea), remoção de tumores e de nódulos, cirurgias de urgência para remoção de corpos estranhos, cesarianas, intervenções ortopédicas, entre outras.

CAPÍTULO II - Revisão bibliográfica sobre a leishmaniose felina (LFel) e outras doenças do gato causadas por hemoparasitas

1. Introdução

Os gatos domésticos (*Felis catus*) estão entre os animais de companhia mais comuns em todo o mundo (Sparkes et al. 2013). Os seus antepassados já existiam entre o sudoeste da Ásia e a Europa, em 4400 a.C. (Smith 2017).

O gato continua a manter muitos comportamentos comuns ao seu ancestral selvagem, *Felis lybica*, o gato selvagem africano. A relação entre gatos e humanos começou há cerca de 10.000 anos atrás, como um relacionamento mutuamente benéfico (Ellis et al. 2013).

O seu papel entre as sociedades de humanos sempre foi importante como agente de controlo de pragas, objeto de valor simbólico e animal de companhia, tendo o Homem a responsabilidade de tentar garantir o seu bem-estar, proporcionando a melhor qualidade de vida possível, incluindo os cuidados médico-veterinários.

Cada vez mais têm sido descritas doenças transmitidas por felinos em todo o mundo. Vários fatores que foram associados a essa acentuada expansão e ampla faixa de distribuição, incluem, as mudanças climáticas, o aumento do comércio internacional e transporte global, aumento da resistência a medicações, mudanças demográficas e políticas e abundância de animais silvestres (Alho 2016).

Os gatos, especialmente os que têm um maior acesso ao exterior, são altamente suscetíveis à exposição a vários artrópodes, como pulgas, carraças e flebótomos, e consequentemente, expostos aos agentes patogénicos transportados pelos artrópodes (Morganti 2019).

Na Europa, a epidemiologia dos agentes patogénicos transmitidos por felinos, geralmente é menos investigada em gatos do que em cães, embora os gatos possam atuar como portadores de artrópodes infetados para humanos e outros animais de estimação que compartilham o habitat doméstico (Morganti 2019).

Dentro destes agentes, incluem-se, *Leishmania infantum*, *Mycoplasma haemofelis*, agente etiológico da anemia infecciosa felina e, as espécies pertencentes à família Rickettsiaceae, as piroplasmoses (infecções parasitárias transmitidas por carraças causadas por agentes dos géneros *Cytauxzoon* e *Babesia*). Estes agentes, são apenas alguns exemplos, de agentes patogénicos transmitidos por felinos (APTFs) dignos de investigação, a fim de esclarecer o potencial papel dos gatos domésticos na manutenção e distribuição desses microorganismos para os seres humanos e para outras espécies animais, como por exemplo, cães em áreas endémicas (Morganti 2019).

2. Leishmaniose felina- LFel

A leishmaniose foi descrita, pela primeira vez, em canídeos, da espécie *Canis familiaris*, em 1908, na Tunísia, por Nicolle e Comte (Pereira 2008). No caso da leishmaniose em gatos (*Felis catus domesticus*), foi descrita pela primeira vez, na Argélia em 1912 (Maia et al. 2008).

Em Portugal, Álvares e Pereira da Silva registaram pela primeira vez, em 1911, a existência de cães parasitados por *Leishmania* na região Metropolitana de Lisboa (Pereira 2008), sendo que em gatos, só foi reportado pela primeira vez, no país, em 1994 (Costa-Durão et al. 1994).

A leishmaniose é uma doença parasitária infecciosa zoonótica, causada por um protozoário do género *Leishmania* que é transmitido durante a refeição dos flebótomos fêmeas. Nestes insetos verifica-se a presença e multiplicação de protozoários flagelados, pertencentes à espécie *Leishmania (donovani) infantum*, em células da linha fagocitária monocelular. Esta doença é caracterizada por lesões viscerais e mucocutâneas podendo atingir todos os órgãos e tecidos que contenham macrófagos (Beugnet et al. 2018).

Existem outras espécies de *Leishmania* que são encontradas em cães e gatos no Novo Mundo, tais como: *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania venezuelensis* (Solano-Gallego et al. 2009; Pennisi 2015a; Pennisi et al. 2018). *Leishmania tropica* e *Leishmania major* foram raramente descritas em cães e principalmente associadas a lesões cutâneas ou mucocutâneas (Baneth et al. 2017; Pennisi et al. 2018). Recentemente, essas últimas espécies foram confirmadas em gatos na Turquia (Pennisi et al. 2018).

Leishmania infantum, anteriormente denominada *L. canis*, uma vez que, infecta canídeos domésticos e selvagens (por exemplo raposas), mas também, lagomorfos e roedores, incluindo o rato-negro e *hamsters*, que também podem ser infetados. Alguns casos de leishmaniose foram relatados em gatos e cavalos. Nos seres humanos, esta infeção afeta historicamente principalmente crianças, donde provém o nome *infantum*. Atualmente, a maioria dos casos é observada em indivíduos imunodeprimidos, especialmente infetados por HIV (Beugnet et al. 2018).

Mais recentemente, tem sido publicada, informação com maior detalhe sobre a leishmaniose felina (LFel) e é notório, o aumento da evidência que existe uma maior semelhança com a leishmaniose canina do que se especulava no passado. Os gatos são agora reconhecidos como potencial reservatório doméstico de *L. infantum*, e assim, as estratégias para prevenir a infeção nestes carnívoros têm sido preconizadas (Brianti et al. 2017).

Segundo Pennisi et al. (2018), a LFel tem surgido como uma doença felina emergente. Nas últimas duas décadas, foi mais frequentemente relatada em áreas endémicas e

esporadicamente, observada em áreas não endêmicas, sobretudo em gatos realojados. Sabe-se ainda que, Portugal é um país endêmico de Leishmaniose canina causada por *L. infantum* (Pereira da Fonseca et al. 2013; Pereira et al. 2019).

Nos gatos, a doença e infeção podem persistir por longos períodos de tempo. Em estudos experimentais, foi observado que os gatos podiam infetar os flebótomos no Velho e Novo Mundo, o que se traduz num fator importante na transmissão de *L. infantum* em regiões onde muitos gatos estão infetados (Pennisi et al. 2015a).

O aumento dos cuidados médico-veterinários, bem como, a disponibilidade de ferramentas de diagnóstico mais sensíveis e o progresso na compreensão das interações entre hospedeiro-vetor-parasita contribuíram para a deteção do aumento emergente do LFel. Embora a proporção de gatos infetados seja sempre menor do que a registada em cães que vivem em áreas endêmicas, estudos epidemiológicos recentes sugerem que, a ocorrência de LFel pode ser maior do que é considerado atualmente (Pennisi et al. 2015a).

Dos poucos casos clínicos relatados na literatura, cerca de metade está associada a condições imunossupressoras concomitantes, como, o vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), diabetes e neoplasias, sugerindo que, estas condições possam atuar como agentes promotores (Brianti et al. 2019).

Atualmente, sabe-se que cerca de 70 espécies, incluindo o Homem, são hospedeiros reservatório naturais de *Leishmania* (Who 2020).

2.1. Agentes Etiológicos

Leishmania pertence aos protozoários flagelados (filo Sarcomastogiphora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae), e existe em 2 formas morfolologicamente distintas nos hospedeiros vertebrados e nos invertebrados (Beugnet et al. 2018).

Cinco espécies do género *Leishmania* foram identificadas em gatos: *Leishmania mexicana*, *Leishmania venezuelensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* no Novo Mundo e, *Leishmania infantum* no Novo Mundo e Velho Mundo. (Pennisi et al. 2015a).

Durante o seu desenvolvimento, *Leishmania* spp. passa por essas duas formas, a promastigota, flagelada e extracelular, que se encontra no inseto vetor, e a amastigota, aflagelada e intracelular, que parasita os macrófagos e outras células, do hospedeiro mamífero.

A forma promastigota é fusiforme, tem cerca de $15 \times 3 \mu\text{m}$ e possui, na sua região anterior, um flagelo livre que pode atingir $20 \mu\text{m}$ de comprimento (Tomás e Romão 2008) (Figura 1).

Relativamente à forma amastigota, ligeiramente ovóide e com um flagelo rudimentar, esta

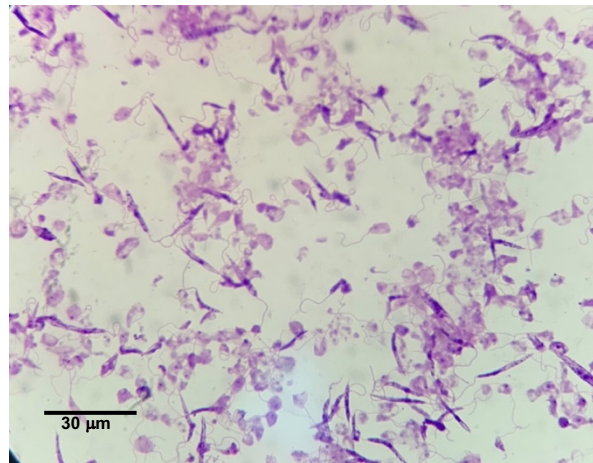


Figura 1- Aspeto da forma promastigota (Foto original de lâmina gentilmente cedida pelo Laboratório de Parasitologia e doenças Parasitárias da FMV-ULisboa)

caracteriza-se por dimensões entre $3-4 \times 2 \mu\text{m}$, tendo um núcleo de grande dimensão e um cinetoplasto, que apresenta uma forma de bastão e que incorpora o corante de uma forma mais evidente e encontram-se no interior do vacúolo parasitóforo dos macrófagos parasitados (Tomás e Romão 2008; Beugnet et al. 2018). A sua multiplicação é efetuada por divisão binária longitudinal e conseguem sobreviver à fagocitose e ao stress oxidativo nos macrófagos (Beugnet et al. 2018).

As leishmanias podem ser encontradas no espaço extracelular quando ocorre lise dos macrófagos ou quando estes são alterados por má técnica de execução (Beugnet et al. 2018) (Figura 2).

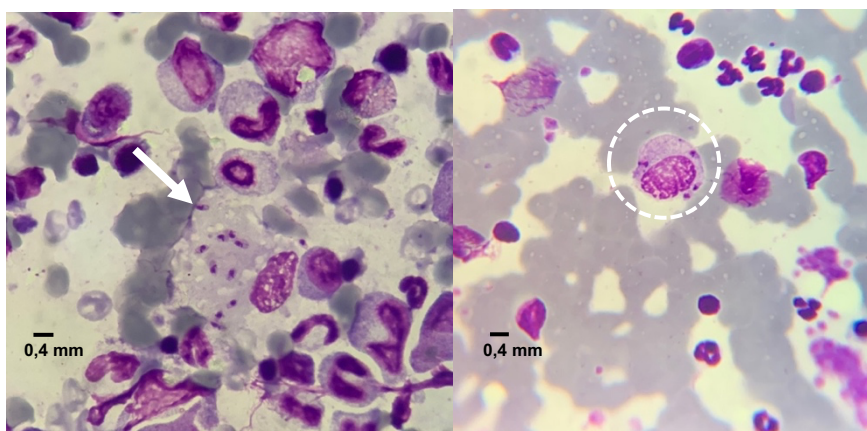


Figura 2 -Aspeto de formas amastigotas livres (seta branca) e no interior de um macrófago (círculo branco). (Foto original de lâmina gentilmente cedida pelo Laboratório de de Parasitologia e doenças Parasitárias da FMV-ULisboa)

2.2. Transmissão

A transmissão vetorial de *Leishmania* por flebótomos é considerada a forma mais importante de transmissão para humanos e animais e, de acordo com vários estudos sobre o hábito alimentar de flebótomos, é provável que também seja na infecção felina, mas nunca foi investigada (González et al. 2017; Pennisi et al. 2015a).

A transmissão não vetorial pode ocorrer em humanos e cães por meio de transfusão de hemoderivados e por via venérea ou vertical (Pennisi 2015), sendo responsável por casos autóctones em áreas não endêmicas (Solano-Gallego et al. 2009). Contudo, faltam informações semelhantes sobre LFel (Pennisi et al. 2018).

No entanto, a transfusão de sangue pode ser uma fonte de infecção em gatos. Nas áreas endêmicas, através de PCR, observou-se ADN de *Leishmania* no sangue de gatos saudáveis, assim como em cães e humanos saudáveis (Pennisi et al. 2015b; Persichetti et al. 2016; Brianti et al. 2017; Pennisi et al. 2018).

2.2.1. Hospedeiro Invertebrado – Flebótomos

Os insetos responsáveis pela transmissão de *Leishmania* spp. pertencem à ordem Diptera, à família Psychodidae, à subfamília Phlebotominae e aos géneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Afonso e Alves-Pires 2008).

Os flebótomos apresentam, geralmente, uma cor acastanhada ou cinzenta, com um comprimento variando entre os 2 e os 3 mm (Afonso e Alves-Pires 2008).

Tanto os machos (Figura 3) como as fêmeas (Figura 4), são fitófagos, pois alimentam-se de sucos vegetais ou de açúcares provenientes de plantas ou de outros insetos, de modo a obterem, a energia necessária à sua sobrevivência. Porém, as fêmeas são também hematófagas, alimentando-se de sangue, de mamíferos, aves ou répteis, para poderem depois efetuar as oviposturas (Pereira da Fonseca et al. 2013).

Os flebótomos, apresentam fraca capacidade de voo e com tendência para se localizarem junto aos locais onde se alimentam (Pereira da Fonseca et al. 2013). O período de maior atividade concentra-se no período crepuscular ou noturno, dependendo da espécie e da época do ano, contudo, quando há interferência do Homem, esta atividade pode-se alterar devido ao “efeito de intromissão” (Afonso e Alves-Pires 2008).

A duração do ciclo de vida é variável, em função da temperatura, humidade e fotoperíodo. Os flebótomos, apresentam preferência por temperaturas moderadas, sendo assim, a sua maior atividade ocorre entre Maio e Outubro (Pereira da Fonseca et al. 2013).

Das 700 espécies flebotomínicas conhecidas, 50 são vetores de *Leishmania* spp.. Deste modo, apresentam suscetibilidade e competência vetorial para uma ou mais espécies de *Leishmania*, isto é, têm a capacidade de se infetarem ao alimentarem-se em hospedeiros

infetados, e de se tornarem infetantes, transmitindo, posteriormente, durante a refeição sanguínea, os parasitas aos hospedeiros vertebrados, sejam eles reservatórios ou hospedeiros acidentais (Afonso e Alves-Pires 2008).

O tipo de biótopos das diferentes espécies flebotomínicas é diversificado, encontrando-se flebótomos, tanto no interior das habitações humanas (endófilos), como no exterior (exófilos). Em Portugal, encontram-se *P. sergenti*, *P. perniciosus* e *P. ariasi*, geralmente abaixo da cota dos 600 metros (Afonso e Alves-Pires 2008). De acordo com a Figura 5, é possível visualizar a sua distribuição.



Figura 4- Flebótomo macho (Foto original)



Figura 3- Flebótomo fêmea (Foto original)

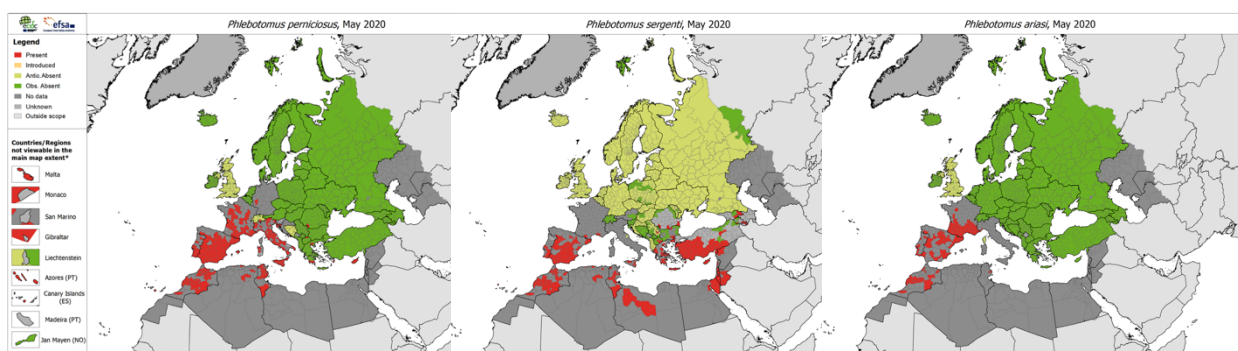


Figura 5- Distribuição de *Phlebotomus perniciosus*, *P. sergenti* e *P. ariasi*, respetivamente, na Europa, atualizado em Maio de 2020. (acedido em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/phlebotomus-perniciosus-current-known-distribution-may-2020>)

2.3. Ciclo de Vida

De um modo geral, no ciclo biológico, há a intervenção de três fatores principais, o parasita, o hospedeiro vertebrado e o hospedeiro invertebrado.

2.3.1. Hospedeiro Invertebrado

No vetor, o desenvolvimento do parasita ocorre no aparelho digestivo. A maior parte das espécies de *Leishmania* do subgênero *Leishmania* têm um desenvolvimento suprapilárico, isto é, no estômago do flebótomo. A infecção vetorial inicia-se quando o vetor fêmea efetua uma refeição sanguínea que contenha macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania* spp. (Afonso e Alves-Pires 2008).

De seguida, os amastigotas diferenciam-se passando por várias fases de desenvolvimento e diferentes localizações no interior do inseto até atingirem a cavidade oral sob a forma de promastigota metacíclicos, constituindo a forma infetante (Figura 6). Para além disso, sabe-se ainda que, as leishmanias promovem a oclusão do lúmen intestinal do inseto obrigando a realizar um maior número de refeições até atingir repleção total, o que pode contribuir para uma maior disseminação do parasita (Pereira da Fonseca et al. 2013).

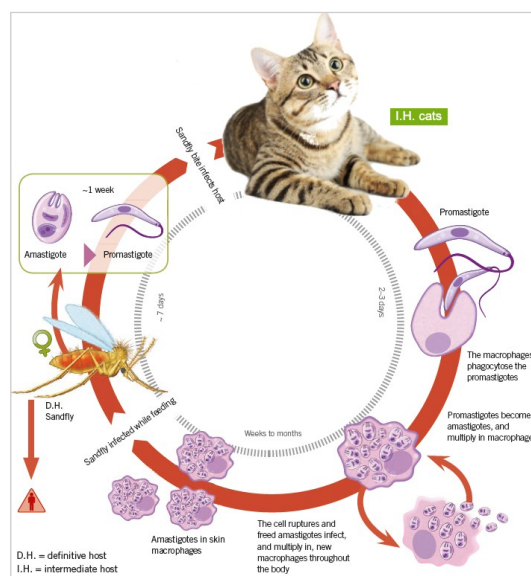


Figura 6- Resumo ilustrativo do ciclo de vida de *L. infantum*. (Adaptado de Beugnet et al. 2018)

2.3.2. Hospedeiro Vertebrado

A transmissão ao hospedeiro vertebrado é feita pela inoculação de promastigotas metacíclicos durante a alimentação de um flebótomo fêmea infectado (Figura 6). O cão é considerado o principal hospedeiro reservatório doméstico do gênero *Leishmania*, contudo, já se sabe que existem outros mamíferos infectados e que também podem desenvolver a doença, como é o caso do gato e até o Homem (Persichetti et al. 2017).

Quando os promastigotas metacíclicos se encontram no hospedeiro vertebrado, estes invadem as células do sistema mononuclear fagocitário, acabando por se disseminar através do sangue e linfa para diversos órgãos internos como o fígado, o baço, a medula óssea e os linfonodos (Figura 4). Através de vários mecanismos de sobrevivência e evasão ao sistema imunitário, as leishmanias conseguem garantir a sua permanência crónica com ou sem desenvolvimento de doença clínica (Pereira da Fonseca et al. 2013).

2.4. Epidemiologia

Segundo a WHO (2020), em 2018, foram considerados endémicos ou foram descritos casos de leishmaniose cutânea e de leishmaniose visceral em 92 e 83 países/territórios respetivamente.

A distribuição de *Leishmania* spp. é refletida pela distribuição dos seus vetores.

L. infantum encontra-se na Bacia do Mediterrâneo, Próximo e Médio Oriente, Ásia Central e China, bem como, na África Ocidental Subsaariana. Na Europa, é endémica em Itália, Sardenha, Sicília, Espanha, Portugal, no terço sul de França, Córsega e Grécia. Também foram relatados casos no Norte de França, Bélgica, Holanda, Inglaterra, Alemanha, mas estes casos, dizem respeito a animais importados infetados e não a casos autóctones (Beugnet et al. 2018; Pennisi et al. 2018). O zimodeme MON1 é o mais frequentemente descrito em cães, gatos e humanos na área do Mediterrâneo (Pennisi et al. 2018).

A emergência desta parasitose, deve-se a diversos fatores, tais como, alterações climáticas, deficientes condições socioeconómicas, alterações do habitat dos hospedeiros naturais e vetores, condições imunossupressoras dos hospedeiros vertebrados e a resistência dos parasitas e dos vetores aos fármacos e inseticidas em uso (Pereira da Fonseca et al. 2013).

O reconhecimento do gato como possível hospedeiro do parasita, foi fomentado pelo aumento do número de casos reportados de LFel. De facto, estes apresentam determinadas características, tais como, o facto de serem uma fonte de alimentação sanguínea para os vetores biológicos e constituir, tal como o cão, um dos animais domésticos mais presentes nas áreas endémicas, que potenciam a suscetibilidade natural à infeção por *L. infantum*, sendo na sua maioria assintomáticos. (Pereira da Fonseca et al. 2013).

A LFel tem sido descrita, principalmente, em áreas onde a CanL é endémica. Na Europa o primeiro caso clínico de LFel documentado em Espanha no ano de 1932 (Basso et al 2016), contudo, só a partir da década de 80 foi possível obter descrições clínicas detalhadas de diversos casos, devido ao avançar das técnicas de diagnóstico e ao crescimento do interesse científico na LFel (Pereira da Fonseca et al. 2013).

Em Portugal, embora o primeiro caso clínico tenha sido notificado na década de 1990, apenas nos últimos anos foram realizados estudos epidemiológicos para melhor compreender o papel dos gatos no ciclo biológico das espécies de *Leishmania* (Basso et al. 2016). Até 2014, apenas cinco casos clínicos de LFel foram notificados em Portugal desde o primeiro diagnóstico da doença, sendo que todos tiveram envolvimento cutâneo (Pimenta et al. 2015).

Sabe-se que também têm surgido mais casos descritos, com envolvimento ocular e/ou visceral além de manifestações cutâneas (Maia et al. 2015).

Apesar de LCan ser altamente endêmica no nordeste de Portugal, com seroprevalências a atingir cerca de 20% em algumas localidades (Cardoso et al., 2004), a prevalência da infecção por *Leishmania* é consideravelmente mais baixa (2,8%) em gatos que vivem em áreas contíguas (Cardoso et al., 2010).

Além disso, inquéritos epidemiológicos recentes confirmaram que a infecção é endêmica na população felina (animais domésticos e errantes) do sul de Portugal, com uma seroprevalência de 4,8% encontrada em 271 gatos através da técnica de aglutinação direta e uma prevalência de 9,9% em 649 gatos após detecção, por PCR, para ADN de *Leishmania* em sangue (Maia et al. 2014).

Na Área Metropolitana de Lisboa, embora a detecção de títulos de anticorpos anti-*Leishmania* aponte para uma baixa prevalência ou, pelo menos, baixo contacto gato-parasita (1,3%), a detecção de ADN de *Leishmania* indica elevados níveis de infecção em gatos errantes (30,4 %) e gatos domésticos (20,3%). Mesmo assim, a maioria dos animais é assintomática (Basso et al. 2016).

2.5. Patogenia

No caso do cão, o tipo de resposta imunitária própria de cada animal infetado mostra-se determinante na forma de como a doença evolui. Assim sendo, em animais resistentes, os parasitas não se mostram capazes de disseminação para além do linfonodo eferente, enquanto nos animais suscetíveis ocorre a multiplicação dos parasitas, com rutura das células infetadas, e a disseminação dos agentes para vários órgãos, tais como a medula óssea, os linfonodos, a pele, o baço, o fígado e os rins, levando ao aparecimento de reações inflamatórias nos órgãos infetados (Alexandre-Pires e Correia 2008).

Com efeito, após a refeição do inseto fêmea e a inoculação das leishmanias na pele do hospedeiro vertebrado, o parasita inicia a sua multiplicação, de imediato, nos macrófagos, no local de inoculação. A falha no desenvolvimento de uma resposta imunitária protetora permite que os parasitas se espalhem, do local de infecção (pele), através dos macrófagos, para zonas como a medula, o baço e o fígado, podendo determinar uma doença crónica que, vem muito comumente, a tornar-se fatal (Pereira da Fonseca et al. 2013).

Na espécie canina, a resistência à doença está associada a uma resposta imunitária celular, mediada por linfócitos TCD4+ (Th1), e à libertação de citocinas (IFN- γ , IL-2 e TNF- α) responsáveis pela indução da atividade anti-*Leishmania* nos macrófagos. Pelo contrário, o desenvolvimento de uma fraca resposta celular, geralmente mista Th1 e Th2, e uma forte resposta humoral, com elevada produção de anticorpos, resulta no desenvolvimento de doença. A elevada produção de anticorpos e consequente deposição de complexos antígenos-anticorpo são ainda responsáveis pelo desenvolvimento de lesões renais, articulares e vasculites típicas desta doença (Pereira da Fonseca et al. 2013).

Até ao momento, nenhum estudo avaliou a imunidade mediada por células específicas contra *L. infantum* em gatos. Contudo, sabe-se que, diferentes respostas imunitárias inatas e adaptativas nos felinos, poderão ser responsáveis pela menor proporção da infeção por *L. infantum* nestes animais, comparativamente com os cães (Priolo et al. 2019).

Segundo Pennisi e Persichetti (2018), foi recentemente observado, num estudo realizado em gatos de Itália e de Espanha, em sangue estimulado *ex vivo*, que em cerca de um quarto das amostras verificou-se a produção de IFN- γ específico contra *L. infantum*. Estes gatos apresentaram, ainda, um nível de anticorpos significativamente mais baixo em comparação com gatos não produtores, o que está de acordo com o descrito anteriormente.

2.6. Sinais Clínicos

Em primeira instância, é importante estabelecer a diferença entre infeção por *Leishmania* e leishmaniose. Infeção, significa que o parasita entrou no organismo e o sistema imunitário do hospedeiro vertebrado, mantém-no controlado. Como tal não há alterações, bioquímicas, hematológicas, nem qualquer sinal clínico. A doença ocorre quando não existe esse equilíbrio entre o parasita e o sistema imunológico e, assim o parasita inicia a sua multiplicação.

Na presença de sinais clínicos, as lesões cutâneas são as que predominam no quadro clínico de LFel. Como alterações inclui-se: nódulos (Figura 7), ulcerações (Figura 9) ou, mais raramente, dermatite exfoliativa. Podem-se apresentar como generalizadas, localizadas, simétricas (Figura 8) ou assimétricas e, podem, apesar de com menor frequência, aparecer em todo o corpo num padrão focal, multifocal, regional ou difuso. Alguns gatos podem apresentar diferentes tipos de lesões cutâneas ou desenvolvê-las posteriormente, podendo coexistir com lesões mucocutâneas (Pereira da Fonseca et al. 2013; Pennisi 2015a).

Relativamente à localização dos nódulos, como os flebótomos têm preferência pelas regiões do corpo com menos pêlo, a cabeça é um dos locais mais afetados (Figura 7, 8 e 12), (face, pavilhão auricular, nariz, região periocular), tal como o pescoço. Para além disso, outras áreas incluem, os membros distais simetricamente, tórax e abdómen (Pereira da Fonseca et al. 2013; Brianti et al. 2019). Os nódulos apresentam tamanho variado e também têm sido

descritos na mucosa anal, sendo de pequeno tamanho (menos de 1 cm), não dolorosos nem pruriginosos, podendo ter uma superfície normal, ulcerada ou com alopecia (Pennisi et al. 2015a).

Os exames histopatológicos das lesões cutâneas permitem evidenciar dermatite granulomatosa difusa em que os macrófagos apresentam no seu interior inúmeras formas amastigotas, perifoliculite granulomatosa ou então, dermatite de interface com menor carga parasitária (Pennisi et al. 2015a).

A forma sistêmica de apresentação de LFel é a menos comum. Os sinais sistêmicos mais frequentes, surgem de forma isolada ou em combinação, sendo estes, por exemplo, linfadenomegália, lesões oculares, gengivoestomatite e diminuição do apetite (Pennisi et al. 2015a). Dentro das lesões oculares, a uveíte (Figura 10) é a lesão mais importante (Pereira da Fonseca et al. 2013, Pennisi et al. 2015a).

As lesões orais consistem em nódulos (língua e/ou mucosa gengival) ou estomatite crônica (Figura 11) (Leishvet 2018). Para além disso, já foi descrito a presença de insuficiência renal e de alterações do aparelho respiratório (Pereira da Fonseca et al. 2013).

Outros sinais clínicos esporádicos também descritos, incluem: mucosas pálidas, hepatomegália, icterícia, caquexia, febre, vômito, diarreia, secreção nasal crônica, esplenomegália, poliúria/polidipsia, dispneia, aborto e hipotermia (Pereira da Fonseca 2013; Pennisi et al. 2015a).

A referência de *Leishmania* como causa de alguns desses sinais clínicos tem sido associada à presença do parasita em exames citológicos ou histopatológicos do fígado, baço, linfonodos, estômago, intestino grosso, rim, mucosa oral, exsudado nasal e tecidos oculares.

Para além disso, a doença clínica é comumente associada a uma imunocompetência devido a diversos fatores, tais como, infecções por FIV e FeLV, tratamento imunossupressor e doenças debilitantes concomitantes, como a neoplasia maligna ou diabetes *mellitus* (Pennisi et al. 2015a).

Como também já descrito nos cães, a infecção por LFel não exclui a possibilidade de doenças concomitantes ou coinfeções. Isto pode influenciar a apresentação clínica e o prognóstico (Pennisi et al. 2015a).

Na prática, geralmente, o quadro clínico corresponde à forma cutânea com dispersão visceral do parasita (Pereira da Fonseca et al. 2013).

A anemia normocítica normocrômica não regenerativa leve a grave é a alteração hematológica mais frequentemente relatada nos casos clínicos. Além disso também pode ser observada pancitopenia moderada a grave associada a aplasia medular. Sabe-se, ainda, que alguns gatos que apresentavam pancitopenia eram FIV positivo (Pennisi et al. 2015a).

Outro achado comum na LFel consiste na presença de hiperproteinemia com hipergamaglobulinemia, tal como nos cães. A hipoglobulinemia foi só ocasionalmente

descrita. A proteinúria renal e o aumento sérico da creatinina foram observados em consultas de acompanhamento de gatos estudados. Linfocitose e um aumento da atividade sérica de ALT apresentavam uma relação significativa com a seroreatividade de *L. infantum* (Pennisi et al. 2015a).

Para além disso, também foi observada infiltração de células inflamatórias em citologia tecidual (aspirados, esfregaços por aposição) e por histopatologia em órgãos como pele, olhos, mucosa oral, fígado, baço e rim, sendo comumente piogranulomatosa ou granulomatosa. Foi também descrita hiperplasia reativa linfóide em órgãos linfóides, como linfonodos e baço, com um número variável de amastigotas de *Leishmania* observados (Pennisi et al. 2015a).

De acordo com a Tabela 1, encontram-se descritas as lesões, anteriormente mencionadas, de acordo com a sua frequência.

Tabela 1- Frequência de alterações clínicas e laboratoriais descritas na LFel (Adaptado das Guidelines do grupo Leishvet 2018).

Alterações clínicas e laboratoriais descritas na leishmaniose felina		
Descritas frequentemente *	Invulgares**	Raras***
Nódulos cutâneos e /ou mucocutâneos e úlceras Linfadenomegália	Lesões oculares Lesões orais Membranas mucosas pálidas Perda de peso- Anorexia - Letargia	Icterícia Hepatomegália Esplenomegália Caquexia - Febre Vômito - Diarreia Poliúria / Polidipsia Desidratação Corrimento nasal crónico Dispneia - Sibilos Aborto Hipotermia
Hipergamaglobulinemia	Proteinúria Anemia não regenerativa ligeira a moderada	Azotémia Hipoalbuminemia Monocitose - Neutrofilia Pancitopenia

*presentes em cerca de 50% dos casos

** presentes em cerca de 30% dos casos

*** presentes em menos de 25% dos casos e dispostos por ordem decrescente de frequência

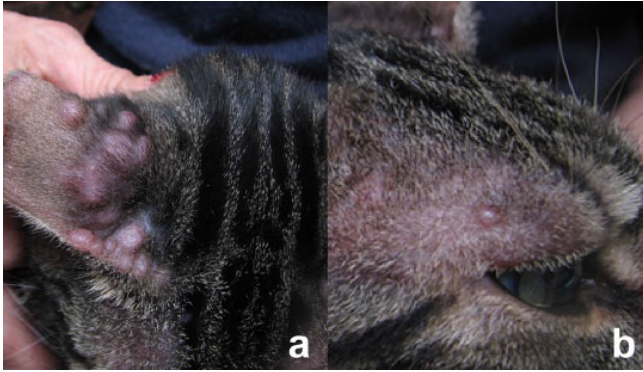


Figura 7- Apresentação clínica de LFel: nódulos cutâneos (2-10mm de diâmetro) distribuídos pela face externa da orelha (a) e regiões orbitais (b), apresentando um padrão coalescente. (Basso et al. 2016).

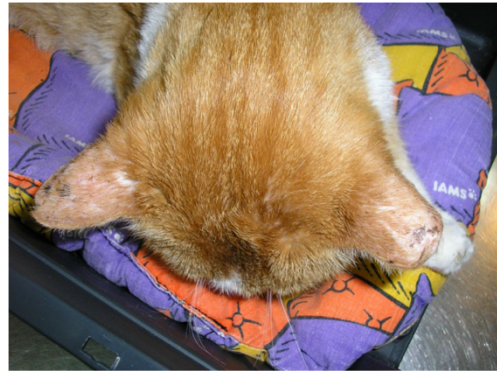


Figura 8- Apresentação clínica de LFel: alopecia simétrica na região externa da orelha e espessamento acral do bordo da orelha esquerda (Pennisi et al. 2015).



Figura 9- Apresentação clínica de LFel: dermatite ulcerativa no membro distal (Pennisi et al. 2015).



Figura 10- Apresentação clínica de LFel, uveíte bilateral com hifema na câmara anterior (Pennisi et al. 2015).



Figura 11- Apresentação clínica de LFel: estomatite e glossite, envolvendo as margens da língua e a mucosa oral (Pennisi et al. 2015)

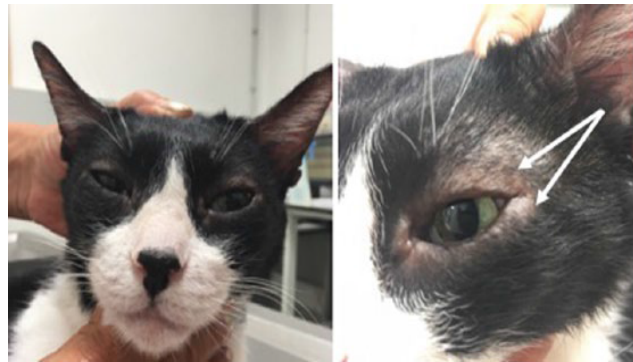


Figura 12- Apresentação clínica de LFel: blefarite bilateral com alopecia periocular leve e quemose leve, blefaroespasmto bilateral e presença de pequenos nódulos palpebrais na pálpebra esquerda superior e inferior (seta) (Leal R, et al. 2018).

2.7. Diagnóstico

O diagnóstico de LFel deve incluir diversos fatores importantes como: a história pregressa do animal, o contexto epidemiológico, os sinais clínicos e os resultados dos métodos complementares de diagnóstico nomeadamente das análises laboratoriais.

Sabe-se que, na ausência de sinais clínicos, um gato que apresente resultados laboratoriais positivos para a presença de parasitas ou para anticorpos, significa respetivamente que, o animal está infetado pelo parasita ou que contactou com o parasita, não implicando que esteja doente. Deste modo, de acordo com a resposta do sistema imunitário do animal, ele poderá ou não desenvolver LFel (Pereira da Fonseca et al. 2013).

Como não existe nenhum sinal patognomónico de LFel, é necessário recorrer ao diagnóstico laboratorial diferencial. Para além disso, é crucial a obtenção de dados epidemiológicos quanto à possibilidade de o gato habitar numa região endémica de CanL ou que se tenha deslocado para uma (Pereira da Fonseca et al. 2013). Como o aumento dos linfonodos é o sinal mais comum, para além, das lesões cutâneas e mucocutâneas, o LFel deve ser incluído na lista de diagnósticos diferenciais quando, durante o exame físico, é observado linfadenomegália generalizada ou localizada (Pennisi et al. 2015a).

A LFel deve ainda ser considerada em gatos com doença oftalmológica, principalmente se apresentarem uveíte aguda, recorrente ou crónica, tendo já sido feito diagnóstico de exclusão de outras condições clínicas semelhantes tais como, FIV, FeLV, FCoV, *Bartonella*, *T. gondii*, infeções fúngicas, neoplasia ou síndrome paraneoplásico (Pennisi et al. 2015a).

A inflamação crónica proliferativa e ulcerativa da mucosa oral associada a LFel pode ser incluída na lista de possíveis causas da gengivoestomatite crónica felina, doença esta que, é bastante comum nos gatos e dolorosa. Os corticosteroides são frequentemente usados para o tratamento, contudo, quando utilizados em gatos com LFel, mais uma vez, podem levar ao agravamento do quadro clínico (Leiva et al. 2005; Pennisi et al. 2015a).

Uma questão que se coloca, é se os gatos aparentemente saudáveis que vivem em regiões endémicas devem ser testados para infeção por *Leishmania*/ LFel. Sabe-se que, *Leishmania infantum* pode infetar gatos aparentemente saudáveis, como acontece nos cães, sendo que a infeção pode persistir sem manifestações clínicas. Como os gatos infetados por *L. infantum* podem não estar doentes e, portanto, não apresentar quaisquer sinais clínicos, é questionável se gatos saudáveis devam ser testados para a LFel (Pennisi et al. 2015a).

Segundo Pennisi et al. (2015a), gatos sem sinais clínicos e/ou alterações clinicopatológicas compatíveis com leishmaniose devem ser testados para infeção por *Leishmania* se forem usados como doadores de sangue, uma vez que, foi demonstrado que em humanos e em cães, que sangue e os seus derivados provenientes de indivíduos infetados podem transmitir infeção. Nestes casos, os testes para pesquisa de anticorpos e a realização

de PCR são recomendados, conforme indicado para cães. Além disso, o teste pode ser feito aquando da realização de viagens para zonas onde a leishmaniose não é endémica e pode exigir que os gatos sejam testados para infeção antes da importação. Finalmente, os gatos com condições clínicas que requerem terapias imunossupressoras devem ser testados preliminarmente em áreas endémicas, uma vez que casos clínicos de LFel foram diagnosticados em gatos a efetuar longos tratamentos com imunossupressores.

O diagnóstico é realizado, maioritariamente, por métodos sorológicos, citológicos, histológicos, de cultura ou por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Pennisi et al. 2015a). Como métodos de diagnóstico de *Leishmania* e/ou LFel destacam-se:

2.7.1. Métodos parasitológicos de observação direta do parasita

São considerados a melhor forma de diagnóstico, sendo económicos e vantajosos, uma vez que, são capazes de detetar diretamente o parasita.

A especificidade é elevada, contudo a sensibilidade varia consoante a amostra utilizada. Permitem a observação de formas amastigotas de *Leishmania*, colhidas por punção aspirativa a partir de lesões cutâneas, linfonodos, baço, medula óssea ou sangue periférico. Sabe-se que, raramente *L. infantum* é encontrada em monócitos e neutrófilos no sangue, o que dificulta a obtenção de um diagnóstico a partir desta amostra (Beugnet et al. 2018).

Após a coloração com derivados de Romanovsky dos esfregaços obtidos, as leishmanias com núcleo corado de vermelho escuro e citoplasma azul claro podem ser observadas em microscópio ótico, livres, ou no interior de macrófagos e por vezes em monócitos e neutrófilos. A carga parasitária pode ser avaliada, no esfregaço, pelo número de parasitas em relação ao número de leucócitos existentes. O aparecimento de apenas uma célula parasitada é considerada como um resultado positivo à infeção (Pereira da Fonseca et al. 2013).

2.7.2. Métodos serológicos para pesquisa de anticorpos

A técnica de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) estão entre os métodos serológicos mais utilizados para diagnóstico e estudo clínico de infeção canina e felina por *L. infantum*. Tanto na IFI como no ELISA, a quantificação, usando títulos de anticorpos ou densidades óticas, permite a classificação dos níveis de anticorpos contra antígenos de *L. infantum* (Persichetti et al. 2017). A análise de *Western blot* (WB), que consiste num método sorológico qualitativo, distingue o peso molecular dos antígenos de *L. infantum* que estimulam a produção de anticorpos. Contudo, esta técnica, é menos frequentemente usada na prática veterinária para o diagnóstico de leishmaniose felina (Persichetti et al. 2017). Estes métodos apresentam elevada sensibilidade e especificidade,

mas apresentam algumas limitações, tais como, não permitirem diagnosticar a doença quando não há produção de anticorpos, ou durante o período de seroconversão ou em alguns animais assintomáticos (Pereira da Fonseca et al. 2013). Contudo, os testes ELISA e WB demonstraram ser mais sensíveis do que o IFI (Persichetti et al. 2017).

De acordo com o tempo de semi-vida dos anticorpos, a deteção de baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* indica que o animal contactou com *Leishmania*, contudo, não significa que este se encontre infetado (Pereira da Fonseca et al. 2013).

No caso dos gatos, o diagnóstico serológico convencional não é suficientemente fiável, uma vez que, quando estes animais estão infetados por *Leishmania*, mantêm-se negativos ou então apresentam um nível baixo de anticorpos específicos. O diagnóstico laboratorial de LFel não deve ser realizado somente com base em métodos serológicos (Pereira da Fonseca et al. 2013).

2.7.3. Métodos moleculares para deteção de ADN de *Leishmania*

De entre os métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada em estudos epidemiológicos, de modo a auxiliar na identificação de espécies de *Leishmania* spp., através da amplificação seletiva de sequências de ADN do parasita (Braga et al. 2014).

A técnica de PCR pode ser aplicada a diversos materiais biológicos como medula óssea, linfonodos, baço, pele, sangue e até amostras histopatológicas (Braga et al. 2014; Pereira da Fonseca et al. 2013). A PCR efetuada a partir de esfregaço da mucosa conjuntival é sensível, económica com a vantagem do método de recolha de amostra não ser invasivo (Pereira da Fonseca et al. 2013).

No caso de uma suspeita clínica, a associação do método molecular, que deteta a presença do parasita, com o método serológico, que permite identificar animais que contactaram com o parasita, é a combinação adequada para diagnosticar LFel (Pereira da Fonseca et al. 2013).

2.7.4. Exame histopatológico

Neste exame, através de um fragmento de biópsia, é possível detetar outras patologias, tais como, o carcinoma das células escamosas, pênfigos foliáceo e granuloma eosinofílico, em gatos com LFel (Maia et al. 2015; Pennisi et al. 2018). A inclusão desta parasitose é indispensável aquando da realização dos diagnósticos diferenciais, sempre que um gato apresente nódulos cutâneos ulcerados e/ou com crostas, especialmente em gatos residentes em zonas endémicas (Pereira da Fonseca et al. 2013). As amostras são coradas com hematoxilina/eosina e permitem observar as formas amastigotas. Contudo, a

sensibilidade para a detecção de *Leishmania* é bastante variável (Pereira da Fonseca et al. 2013).

2.7.5. Outras técnicas de diagnóstico

As culturas *in vitro* de amastigotas de *Leishmania* raramente são utilizadas no diagnóstico (Maia et al. 2015; Pennisi et al. 2015a; Pennisi et al. 2018). Embora apresentem uma especificidade de 100% são morosas, facilmente contamináveis por agentes microbianos e muito exigentes quanto ao meio de cultura (Pereira da Fonseca et al. 2013).

2.7.6. Análises hematológicas e bioquímicas

Na presença de LFel, é frequente observar-se alterações hematológicas como a anemia não regenerativa, a leucopénia, a trombocitopenia e o aumento da ureia e creatinina. O aumento das proteínas totais sanguíneas, sobretudo gamaglobulinas, tem também sido referido (Pennisi et al. 2015a).

2.8. Tratamento

Como já mencionado anteriormente, a LFel é uma doença ainda pouco descrita, sendo que ainda não existe estudos controlados publicados sobre a terapêutica de LFel (Baneth et al. 2018).

Perante um caso de LFel, o tratamento empírico com os mesmos fármacos recomendados para os cães é geralmente considerado eficaz e aparentemente seguro. Para além disso, também já foi descrito que a remoção cirúrgica de nódulos cutâneos (realizada em dois gatos) foi seguida por recidiva de lesões cutâneas (Pennisi et al. 2014).

Deste modo, de acordo com Pennisi et al. (2015a) serão destacadas as terapêuticas que apresentaram melhores resultados (Tabela 2), entre as quais:

2.8.1. Análogos das Purinas

A administração de alopurinol, (10 mg/kg a cada 12h, ou 20 mg/kg, SID, PO, durante pelo menos 6 meses) tem sido mais frequentemente utilizado do que antimoniato de meglumina, contudo, as informações ainda são escassas relativamente às suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas e também sobre a sua segurança (Pennisi et al. 2015a; Baneth et al. 2018; Brianti et al 2019).

O alopurinol é geralmente bem tolerado, no entanto, num gato, a elevação das enzimas hepáticas foram descritas com 10 mg/ kg BID e a dose foi reduzida para 5 mg/kg BID. A melhoria clínica foi observada na maioria dos casos tratados com alopurinol, até

mesmo em gatos FIV positivo, durante algumas semanas após o tratamento ou mesmo em tratamentos mais lentos após 6 meses (Pennisi et al. 2015a).

Para além disso, conseguiu-se alcançar a cura clínica com o alopurinol contudo, ocorreu a recidiva após descontinuação do tratamento, sugerindo a hipótese que, os animais ainda poderiam estar infectados (Pennisi et al. 2015a).

De acordo com Brianti et al. (2019), foi possível confirmar a possível progressão da infeção por *L. infantum* num paciente felino, mesmo na ausência de comorbilidades. Embora o tratamento a longo prazo com alopurinol tenha melhorado a manifestação clínica, não houve sucesso no controlo da doença (Pennisi et al. 2015a; Brianti et al. 2019).

2.8.2. Antimoniato Pentavalentes

Antimoniato de meglumina (20-50 mg/kg, SID, SC, por 20 a 30 dias).

Este fármaco também podem ser administrado em combinação com o alopurinol. Contudo, os gatos que realizem tratamento com alopurinol ou antimoniato de meglumina devem ser cuidadosamente monitorizados em relação a quaisquer efeitos adversos (Baneth et al. 2018).

A cura clínica foi geralmente obtida nos poucos gatos que foram tratados com antimoniato de meglumina, mas o tratamento a longo prazo (superior a 55 dias) não está disponível para esses casos (Pennisi et al. 2015a).

Tabela 2- Protocolos terapêuticos usados em gatos afetados por LFel. (Adaptado das Guidelines do grupo LeishVet 2018).

Fármaco e Dosagem	Duração
Alopurinol (10-15 mg/kg BID, 20mg/kg SID, 25 mg/gato/12h, 100 mg/gato SID PO)	6 meses- 3 anos
Antimoniato de meglumina (20-50 mg/kg SID SC)	20-30 dias
Alopurinol (10-15 mg/kg BID PO) em combinação com Antimoniato de meglumina (20-50 mg/kg SID SC)	30 dias

SC: subcutâneo; PO: *Per os*; IM: intramuscular

2.9. Monitorização e Prognóstico

A recorrência de sinais clínicos pode ocorrer, sendo que a monitorização cuidadosa após o final do tratamento anti-*Leishmania* deve incluir exame físico, hemograma, perfil bioquímico, análise de urina e serologia quantitativas nas frequências indicadas abaixo (Tabela 3).

A esperança de vida de gatos com LFel é geralmente boa (anos) a menos que ocorram afeções concomitantes (neoplasia, infeções por FIV/FeLV) ou complicações (doença renal).

Tabela 3-Regime de acompanhamento (Adaptado das Guidelines do grupo LeishVet 2018).

Ação	Frequência
Exame físico	Pelo menos, semanalmente (antimoniato de meglumina) ou quinzenalmente (alopurinol) durante o primeiro mês de tratamento.
Hemograma	A cada 3 meses no primeiro ano ou após a interrupção do tratamento.
Perfil bioquímico	A cada 3 meses no primeiro ano ou após a interrupção do tratamento.
Análise de urina, incluindo UPC*	A cada 6 meses após o primeiro ano.
Serologia quantitativa	A cada 3 meses no primeiro ano ou após a interrupção do tratamento. A cada 6 meses após o primeiro ano.

*UPC: rácio proteína: creatinina na urina.

2.10. Prevenção

Existem duas principais razões para a aplicação de medidas preventivas contra a infeção por *L. infantum* num hospedeiro suscetível e reservatório como o gato: para proteger o animal do risco de desenvolver uma doença clínica; e contribuir para a redução da prevalência da infeção numa área geográfica (Pennisi et al. 2015a).

No sistema biológico da leishmaniose, os flebótomos são os transmissores do parasita. Para que se possa efetuar um controlo eficaz do(s) vetore(s), é necessário conhecer a distribuição das espécies, a abundância, a densidade, as taxas de infeção, a endo ou exofagia, a endo ou exofilia, as preferências tróficas, isto é, não só conhecer a existência dos flebótomos numa determinada região, mas também, os seus comportamentos face às condições climáticas, ambientais e à presença humana e dos reservatórios animais (Afonso e Alves-Pires 2008).

É aconselhável ter em especial atenção, a população felina residente em áreas endémicas. Para tal, deve-se promover a proteção individual dos gatos em risco de desenvolvimento de infeção e doença clínica, assim como, melhorar o controlo dos vetores (Baneth et al. 2018).

Devido à ausência de estudos sobre vacinas contra *Leishmania* em gatos, a melhor estratégia para prevenir a infeção por *L. infantum* nos gatos poderá ser o uso de inseticidas tópicos com aplicação de compostos químicos com atividade repelente ao flebótomo, semelhantes aos usados para cães (Baneth et al. 2018; Pennisi et al. 2015a).

A estratégia mais promissora para prevenção de infeção por *Leishmania* spp. em cães, consiste na utilização de piretróides sintéticos em diferentes formulações (unção punctiforme, colar e aerossóis por exemplo) com propriedades repelentes contra os flebótomos. Contudo,

a maioria dos piretróides, exceto a flumetrina, são tóxicos para os gatos dificultando os estudos sobre a prevenção da infecção por *L. infantum* nesta espécie.

Foi ainda observado que, uma coleira presente no mercado, contém a combinação de 10% imidaclopride e 4,5% flumetrina, que demonstra ser segura e efetiva para a redução do risco de infecção por *Leishmania* nos felinos. Esta coleira é atualmente o único meio de prevenção contra esta infecção, uma vez que ainda não existe qualquer tipo de vacinação disponível para os gatos, que permita reduzir a gravidade da doença (Brianti et al. 2017).

2.11. Outras doenças parasitárias hemáticas do gato

2.11.1. Hemoplasmose (Mycoplasmosse)

Os micoplasmas hemotrópicos, ou hemoplasmas, são bactérias não cultiváveis *in vitro*, pleomórficas, que infetam os eritrócitos, aderindo à sua superfície. A nível de dimensões, apresentam cerca de 0,3 µm de diâmetro, não têm parede celular e são Gram negativas (Thrall et al. 2012).

Estas bactérias aderem e crescem na superfície dos eritrócitos, causando doença clínica, especialmente quando associadas com outros distúrbios ou doenças imunossupressoras, como infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) ou pelo vírus da leucemia felina (FeLV) (Duarte et al. 2014).

Três espécies principais de hemoplasmas foram descritas em gatos, a saber, *Mycoplasma haemofelis* (Mhf), *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (CMhm) e *Candidatus Mycoplasma turicensis* (CMt) (Duarte et al. 2014).

A infecção por hemoplasmas foi identificada tanto em gatos saudáveis, como em doentes. A doença causada por CMhm e CMt está mais frequentemente associada a infeções concomitantes com outras espécies de hemoplasmas ou a infecção por retrovírus, enquanto Mhf é considerado um agente patogénico primário (Duarte et al. 2014).

Embora os hemoplasmas pareçam ser de baixo risco para as pessoas, já foi descrito infecção por organismos semelhantes e uma infecção, num humano, por uma espécie de hemoplasma que poderia ser proveniente de um gato (Lappin et al. 2020a).

A via de transmissão ainda é desconhecida, embora vetores artrópodes, transfusões de sangue sem triagem prévia e/ou interações agressivas entre gatos, resultando em exposição a sangue contaminado, tenham sido sugeridas (Duarte et al. 2014).

A presença destes agentes na saliva já foi descrita, assim como, a transmissão da infecção após a inoculação subcutânea de sangue contendo hemoplasmas (Lappin et al. 2020a).

Observou-se também, a amplificação do ADN do hemoplasma felino, através de pulgas e carraças. No entanto, isso não equivale à transmissão pelo vetor, uma vez que, a presença

de ADN de hemoplasmas poderia apenas refletir sua atividade hematófaga em hospedeiros infectados (Duarte et al. 2014).

Estudos sobre *Ctenocephalides felis*, mostraram apenas transmissão muito transitória da infecção por *M. haemofelis* em gatos infectados experimentalmente devida à atividade hematófaga das pulgas, contudo sinais clínicos e hematológicos de infecção por *M. haemofelis* não foram induzidos no gato recetor (Lappin et al. 2020a).

Os sinais clínicos da doença dependem do grau de anemia, do estágio da infecção e do estado imunológico dos gatos infectados (Duarte et al. 2014). Num estudo de Michael Lappin, (2020a) detetou-se uma associação entre *M. haemofelis* e febre em gatos sem anemia. A anemia hemolítica, com ou sem febre, pode ocorrer após infecção com hemoplasmas patogênicos, especialmente Mhf, mas às vezes também com CMhm e CMt (Duarte et al. 2014).

Portanto, é importante que estes agentes etiológicos constassem na lista de diagnósticos diferenciais para gatos com histórico de brigas e febre, principalmente se a febre não responder aos antibióticos betalactâmicos (Lappin et al. 2020a).

O diagnóstico de hemoplasmosse pode ser baseado na demonstração do organismo na superfície dos eritrócitos, no exame de um esfregaço de sangue, ou através da detecção de ADN por PCR. O número de organismos varia, logo, o exame de esfregaço pode apresentar baixa sensibilidade para o diagnóstico (0–37,5%). Quando adequadamente executado, a PCR é muito mais sensível e específica do que a citologia. No entanto, gatos saudáveis também podem ser positivos para ADN de hemoplasmas no sangue e, portanto, os resultados de PCR nem sempre se correlacionam com doença clínica (Lappin et al. 2020a).

A doxiciclina, frequentemente administrada como uma suspensão aromatizada (para evitar esofagite e estenoses esofágicas) a 10 mg/kg PO SID ou 5 mg/kg PO BID, é geralmente eficaz para o tratamento da hemoplasmosse felina clínica. A duração da terapêutica recomendada varia, mas normalmente é de 2 a 4 semanas (Tasker et al. 2018).

Em gatos com intolerância à doxiciclina, as fluoroquinolonas também se apresentam eficazes. A administração de marbofloxacin ou orbifloxacin deu resultados semelhantes à doxiciclina em dois estudos realizados por Tasker et al. (2006) e Lappin et al. (2012).

A pradofloxacin tem se mostrado promissora na eliminação da infecção por *M. haemofelis* em alguns gatos inoculados experimentalmente. Um estudo recente relatou que, para facilitar a eliminação de *M. haemofelis*, quando tal é necessário, o tratamento com doxiciclina é administrado por 28 dias, seguido de monitorização do número de cópias no sangue por PCR quantitativa. Os tutores devem ser informados de que as recidivas podem ocorrer durante o tratamento, mas são incomuns (Lappin et al. 2020a).

No entanto, a distribuição geográfica agrupada da infecção em alguns estudos apoia fortemente o papel de um artrópode vetor na transmissão dos hemoplasmas e, portanto, são

frequentemente considerados como agentes de infecções transmitidas por vetores. O controle das pulgas e a prevenção de lutas entre gatos contribuem para a diminuição do risco de adquirir hemoplasmoses (Lappin et al. 2020).

2.11.2. Babesiose

A babesiose nos gatos domésticos é causada por protozoários do Filo Apicomplexa, gênero *Babesia* que infetam os eritrócitos e induzem a anemia. Sabe-se ainda que, estes parasitas transmitidos por carrapatos que infetam uma variedade de animais domésticos e selvagens e podem induzir doenças moderadas a graves. Além disso, estão intimamente relacionados a outros piroplasmídeos, como as espécies *Theileria* e *Cytauxzoon* (Beugnet et al. 2018).

A babesiose em gatos domésticos é mais rara como entidade clínica em comparação com a babesiose canina. As espécies de *Babesia* são frequentemente agrupadas em espécies de piroplasmas intraeritrocitários grandes (2,5-5,0 µm) ou pequenos (1,0-2,5 µm) (Beugnet et al. 2018).

A infecção por espécies de *Babesia* que infetam cães foi detectada em gatos sem evidência de infecção clínica por técnicas moleculares. Várias espécies de carrapatos, incluindo *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus*, *Dermacentor* sp., *Rhipicephalus sanguineus* e *Haemophysalis* spp. parasitam gatos e são possíveis vetores de *Babesia*. Outras vias de transmissão relatadas em infecções caninas, incluindo a transmissão vertical e a direta, não foram descritas de forma consistente em gatos (Beugnet et al. 2018).

Na África do Sul e em partes da Ásia, há um grande número de espécies de *Babesia* que infetam gatos. Na Europa, o DNA de *Babesia vogeli* e *Babesia vulpes* foi amplificado através da colheita de carrapatos de gatos, sendo que foram observados anticorpos reativos para *B. vulpes*. Na América do Norte e do Sul, *B. vogeli* e *Babesia gibsoni* foram descritas em gatos em infecções simples e mistas (Lappin et al. 2020).

As espécies *B. vogeli* e *Babesia canis* são provavelmente mais prevalentes em áreas com altas taxas de infecção por *Rhipicephalus sanguineus*. No entanto, não foi determinado se esses agentes induzem febre em gatos isoladamente ou em coinfeção (Beugnet et al. 2018).

Os testes sorológicos não foram validados para esses agentes em gatos. Assim, o diagnóstico atualmente é baseado na detecção de piroplasmas em eritrócitos ou amplificação de ADN específico por ensaio de PCR (Lappin et al. 2020).

Os medicamentos anti-protozoários e os cuidados de suporte são fundamentais para o tratamento. Atualmente, o tratamento de eleição, é o fosfato de primaquina, um composto anti-malárico, sendo consideradas eficazes as seguintes doses: administração de 0,5 mg/kg PO a cada 24 horas durante 1 a 3 dias, ou 1 mg/ gato IM a cada 36 horas, num total de quatro

doses, ou ainda, 1 mg / gato a cada 7 dias num total de quatro doses. A resposta ao tratamento é geralmente boa, mas a recorrência dos sinais clínicos e infecções crônicas persistentes são possíveis e a repetição ou o prolongamento do tratamento podem ser necessários (Hartmann et al. 2013).

2.11.3. Hepatozoonose

O género *Hepatozoon* pertence ao Filo Apicomplexa e família Hepatozoidae contém mais de 340 espécies infectando uma ampla variedade de anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Basso et al. 2019; Díaz-Regañón et al. 2017).

A infecção por *Hepatozoon*, em gatos domésticos, foi observada pela primeira vez na Índia em 1908 (Basso et al. 2019). Já foi descrita a sua presença, em diversos países, tais como, Brasil, França, Índia, Israel, Nigéria, Portugal, África do Sul, Espanha e EUA. Geralmente, considera-se que a infecção é principalmente subclínica, embora os efeitos patogénicos possam ser exacerbados em animais sujeitos a stress e imunocomprometidos ou com infecções concomitantes (Díaz-Regañón et al. 2017).

Em felinos, ainda só foram descritas três espécies diferentes de *Hepatozoon* na Europa: *H. felis*, *H. canis* e *H. silvestris*. Contudo, *H. felis* tem sido a espécie mais frequentemente diagnosticada em casos de Hepatozoonose felina em vários países (Basso et al. 2019).

A principal via de transmissão é através da ingestão do hospedeiro definitivo, um artrópode hematófago, pelo hospedeiro vertebrado intermediário (Díaz-Regañón et al. 2017).

Gatos infectados com *H. felis*, normalmente, apresentam infecção nos músculos do miocárdio e esquelético (Lloret et al. 2015).

A técnica de PCR é utilizada para a pesquisa de ADN de *Hepatozoon*, de modo a confirmar o diagnóstico (Lappin et al. 2020b).

Segundo Basso et al. (2019) foram descritos poucos casos clínicos de infecção por *Hepatozoon*, em gatos, e os protocolos de tratamento não estão claramente definidos. No entanto, o tratamento de um felino infectado por *H. felis* segundo o protocolo usado em cães, através da associação de dipropionato de imidocarb (6 mg/kg de peso corporal, repetido após 14 dias) com monohidrato de doxiciclina (5 mg/kg de peso corporal duas vezes ao dia, PO, por quatro semanas), permitiu que o animal, recuperasse totalmente após o tratamento.

2.11.4. Dirofilariose/ Achantocheilonemose

A Dirofilariose é uma doença causada pelo helminte *Dirofilaria*, um nemátode da ordem Spirurida e da família Onchocercidae, transmitido por um hospedeiro intermediário culicídeo (géneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*) (Meireles et al. 2014).

Dirofilaria immitis e *Dirofilaria repens* são as dirofilárias mais importantes, causando dirofilariose e dirofilariose subcutânea, respectivamente. *D. repens* é atualmente considerado um agente zoonótico emergente na Europa (Pennisi et al. 2020).

As dirofilárias infetam principalmente cães, mas também gatos, furões, carnívoros selvagens e humanos. Em comparação com os cães, os gatos são hospedeiros imperfeitos. Após a inoculação, apenas um pequeno número de larvas L3 se desenvolverá até ao estágio adulto numa pequena percentagem de gatos (Pennisi et al. 2020).

A dirofilariose subcutânea pode manifestar-se por nódulos ou dermatite (Pennisi et al. 2020). Num estágio mais avançado da doença, pode surgir a síndrome de doença respiratória associada à dirofilariose, resultando em inflamação pulmonar e tromboembolismo, muitas vezes levando a lesão pulmonar aguda fatal. Os sinais clínicos associados à dirofilariose cardiopulmonar felina incluem taquipneia, tosse e aumento do esforço respiratório, anorexia, vômito, diarreia e perda de peso e manifestações neurológicas ocasionais (Neves et al. 2020).

A doença arterial pulmonar, associada à exposição a *D. immitis*, é considerada mais grave em gatos do que em cães, devido ao aumento da atividade dos macrófagos intravasculares pulmonares nos felinos (Pennisi et al. 2020).

O diagnóstico em gatos é mais difícil do que nos cães e requer uma abordagem realizada em várias etapas, devendo ser acompanhados por radiografia torácica, ecocardiografia e teste de antígeno e anticorpos para a obtenção do diagnóstico correto e determinar o tratamento adequado (Meireles et al. 2014, Pennisi et al. 2020).

Não há adaltecida aprovado para o tratamento de dirofilariose felina, e a terapia adaltecida não é recomendada em gatos assintomáticos, uma vez que, a cura espontânea ocorre, na maioria dos casos, entre 18 a 48 meses. No que se refere ao tratamento, a prednisolona (2 mg/kg PO SID, diminuindo gradualmente para 0,5 mg/kg, em dias alternados, durante 2 semanas e, em seguida, descontinuado após mais 2 semanas), deve ser administrada a gatos com sinais respiratórios e com resultados positivos nos teste de pesquisa de antígeno de *Dirofilaria* e/ou anticorpo anti-*Dirofilaria* (Jones et al. 2014). O tratamento com prednisolona também deve ser administrado a gatos assintomáticos com alterações radiográficas sugestivas, e feito o seguimento por métodos laboratoriais, e e radiográficos (Pennisi et al. 2020).

Relativamente à profilaxia, devido ao curso imprevisível e potencialmente fatal de dirofilariose em gatos, e a falta de tratamentos seguros e eficazes, todos os gatos em áreas endémicas, independentemente de seu acesso ao ar livre, são aconselhados a realizar quimioprofilaxia mensal a partir dos 2 meses de idade, ao longo do ano, para eliminar as larvas infetantes nos estádios L3-L4 (Pennisi et al. 2020).

2.11.5. Cytauxzoonose

A cytauxzoonose é uma doença causada por hemoparasitas pertencentes ao filo Apicomplexa e ao género *Cytauxzoon* (Theileriidae) transmitidos por carraças.

Em algumas regiões onde a cytauxzoonose é endémica, a prevalência em gatos domésticos pode chegar a ser superior a 30%. Um foco endémico de infeção por *Cytauxzoon* sp. foi descrito na região noroeste da Itália com uma prevalência de 30%. Nesta região, não existiu associação entre a prevalência de infeção e outros fatores tais como: sexo, idade, presença de carraças e/ou pulgas, estado clínico sinais laboratoriais como anemia, presença de FIV e/ ou estado de infeção por FeLV e taxa de mortalidade (Beugnet et al. 2018).

Alho et al. (2016) descrevem o primeiro caso de *Cytauxzoon* sp. em Portugal. Neste estudo, um gato doméstico, macho de 2 anos, apresentava uma história de quadro agudo letargia, anorexia e pirexia. Após a pesquisa molecular para a deteção de agentes causadores de anemia infecciosa, o animal testou positivo para Piroplasmorida. Através da sequenciação do ADN, o gene 18S rRNA (número de acesso GenBank KU710344) revelou 99,9% de compatibilidade com *Cytauxzoon manul*.

A cytauxzoonose causada por *Cytauxzoon felis* é mais frequentemente identificada em gatos jovens com acesso ao exterior e com histórico de parasitismo por carraças. A maioria dos casos ocorre entre abril e outubro, o que corresponde ao pico de atividade da carraça (Beugnet et al. 2018).

Ao exame físico, os sinais que podem levar à consideração deste agente no diagnóstico diferencial incluem, febre alta, membranas mucosas pálidas por choque ou anemia, icterícia, esplenomegalia e hepatomegalia. Contudo não existe nenhum sinal patognomónico da doença. A ampla variedade de sinais clínicos impossibilita a confirmação ou exclusão do diagnóstico com base exclusivamente na avaliação clínica (Alho et al. 2016).

O diagnóstico definitivo pode ser obtido através da visualização de células reticuloendoteliais repletas de esquizontes de *Cytauxzoon*. Da mesma forma, a visualização de piroplasmas (organismos de 1-2 µm com citoplasma azul claro e um núcleo vermelho escuro) no interior de eritrócitos, em esfregaços de sangue periférico corados com Giemsa, pode auxiliar no diagnóstico. A confirmação pode ser feita com um método mais sensível e específico, como a PCR, embora não possa ser usado para diferenciar entre cytauxzoonose aguda e crónica (Alho et al. 2016).

Até o momento, os gatos mostraram uma melhor resposta ao tratamento, aquando da combinação de azitromicina (10 mg/kg PO SID) e atovaquona (15 mg/kg PO TID), com uma taxa de responsividade de, aproximadamente, 60%. Esta combinação apresenta resultados superiores aos protocolos de diminazeno ou imidocarb (Lappin et al. 2020b).

A fraca resposta ao tratamento nos casos clínicos de cytauxzoonose é um exemplo perfeito da necessidade de um controlo preventivo e efetivo da infeção por carraças. O uso

adequado de acaracidas permite diminuir o risco de transmissão deste agente. Em estudos recentes, foram analisados os efeitos da aplicação de uma unção punctiforme contendo sarolaner para bloquear a transmissão de *C. felis* por *A. americanum* (Lappin et al. 2020b). Neste estudo foi demonstrado que, a aplicação de selamectina / sarolaner resultou em $\geq 94,7\%$ de eficácia contra *A. americanum* 72 h pós-infecção, após três tratamentos mensais (Reichard et al. 2019).

CAPÍTULO III- Infecção por *Leishmania* spp./Leishmaniose em gatos na Península de Setúbal

1. Objetivos

Este estudo teve como objetivos:

1. Determinar a proporção de infecção por *L. infantum* em gatos através da pesquisa anticorpos anti-*Leishmania* na Península de Setúbal;
2. Determinar a presença de infecção por outros hemoparasitas, através de esfregaço de sangue, nos mesmos animais;
3. Verificar a possível associação entre fatores de risco utilizando a informação recolhida após o preenchimento de um questionário pelos tutores, de forma a analisar a influência de diversos fatores, (idade do animal, presença de outras doenças, de outros animais de companhia, tipo de vegetação à volta da habitação, alturas do dia em que tem acesso à rua, desparasitações e vacinações, etc.) e informando simultaneamente os tutores, sobre a doença e a sua prevenção;
4. Contribuir para o conhecimento sobre a infecção por *Leishmania* em gatos e o seu possível impacto na relação entre animais e humanos considerando o conceito “One Health”.

2. Material e métodos

2.1. Caracterização da Península de Setúbal

O presente estudo foi realizado na Charneca da Caparica, pertencente ao concelho de Almada, contudo vários gatos são provenientes de outros concelhos, pertencentes à Península de Setúbal (Figura 13), sendo que será dado mais ênfase aos concelhos de onde provêm os gatos incluídos no estudo, tais como Almada, Seixal e Palmela.

A Península de Setúbal consiste numa sub-região estatística portuguesa, parte da atual Área Metropolitana de Lisboa (designada então de Região de Lisboa), que abrange a parte norte do Distrito de Setúbal. A nível de limitação tem a norte o Estuário do Tejo e, através dele, com a Grande Lisboa, e com a Lezíria do Tejo, a leste com o Alentejo Central, a sul com o Alentejo Litoral e a Sudoeste com o Oceano Atlântico. Tinha uma área de 1 421 km² e a uma população, de acordo com os censos de 2011, de 779 373 habitantes (Censos 2011).

O clima da região apresenta características mediterrâneas, com uma clara influência atlântica, sendo a Península de Setúbal caracterizada por possuir um clima sub-húmido e temperado com um Verão quente e seco e um Inverno pouco frio e chuvoso (ADREPES 2020).



Figura 13- Mapa da Península de Setúbal (adaptado de: <https://codigopostal.ciberforma.pt/distrito-de-setubal/>).

O concelho de Almada fica situado no distrito de Setúbal, mais concretamente na província da Estremadura, pertencente à área Metropolitana de Lisboa. Este concelho apresenta uma área com cerca de 71 km² e é composto por 11 freguesias: Almada, Cacilhas, Caparica, Charneca da Caparica, Cova da Piedade, Feijó, Laranjeiro, Pragal, Sobreda e Trafaria (Censos 2011).

Relativamente às suas fronteiras, é delimitado pelo rio Tejo a norte e nordeste, por Seixal a leste, Sesimbra a sul e o oceano Atlântico a oeste. (CMA 2020a).

Este concelho, caracteriza-se pelo facto de constituir uma zona de espaços aberto. Nesta região incidem, em alternância, climas com maior influência atlântica e maior influência continental, seguindo um ritmo bastante caprichoso no que respeita à escala temporal (CMA 2020a).

Neste contexto, Almada pode caracterizar-se como tendo um clima temperado, com uma temperatura média anual que ronda os 16,5°C. As temperaturas mais elevadas registam-se nos meses de Verão, normalmente em Julho e Agosto, e as mais baixas no Inverno, nomeadamente nos meses de Novembro, Dezembro e Janeiro (CMA 2020a).

No que se refere ao regime de ventos, o rumo predominante é o de Noroeste, sendo também frequentes os ventos de Sudoeste, Nordeste e Norte, que sopram, quase sempre, de fracos a moderados. No entanto, pode considerar-se o Concelho de Almada como uma zona ventosa, visto que são poucos os dias em que ocorre a situação de calma, quando o vento regista velocidades inferiores a 1 km/h (CMA 2020a).

Relativamente ao município do Seixal, este apresenta uma extensão de 95 km² de superfície, composto pelas freguesias de Aldeia de Paio Pires, Amora, Arrentela, Corroios,

Fernão Ferro e Seixal, situa-se na Península de Setúbal e pertence à Área Metropolitana de Lisboa (AML) (CMS 2020).

Palmela constitui-se como um dos 18 municípios da Área Metropolitana de Lisboa (AML) e como o maior da Península de Setúbal, com aproximadamente 462Km² e 64.230 residentes. O concelho de Palmela está dividido em quatro freguesias: Palmela, Pinhal Novo, Quinta do Anjo e União das Freguesias de Marateca e Poceirão. Abrangendo uma vasta área das bacias do Tejo e do Sado, o concelho é um território de transição entre o meio urbano e o meio rural. O concelho de Palmela está situado numa zona de clima temperado, embora com influências mediterrânicas e atlânticas. As temperaturas médias oscilam entre os 11°, em Janeiro, e os 23°, em Agosto e apresenta baixos níveis de precipitação (CMP 2020).

2.2. Caracterização geral da população de gatos em estudo

O estudo da infeção por *L. infantum* e de hemoparasitas agentes de outras doenças no gato, foi realizado num total de 34 gatos no concelho de Almada no período compreendido entre novembro de 2019 e março de 2020. Toda a população em estudo apresentava tutores, que se deslocaram ao Hospital Veterinário Principal, situado na Charneca da Caparica, por motivos de consulta.

O presente estudo foi então, realizado na Charneca da Caparica, pertencente ao concelho de Almada, contudo, incluiu vários gatos provenientes de outros concelhos, pertencentes à Península de Setúbal.

De forma a caracterizar melhor a população dos gatos presentes no estudo, foram realizados inquéritos aos seus tutores (Anexo 1), tendo sido registados os seguintes dados: no que diz respeito aos tutores, se era responsável pelo animal em questão, idade, sexo, ocupação, localidade de habitação, meio onde vivia, presença de aves, casa com espaço exterior, a existência perto da habitação de caixotes de lixo, águas paradas, muros com fendas, material em decomposição e presença de vegetação exterior. No que diz respeito a informações gerais sobre o gato, incluíram-se: idade, sexo, se era o primeiro gato, raça, há quanto tempo o tinha, se existiam mais gatos em casa, se algum estava doente e qual a doença, acesso à rua e se sim, qual a altura do dia, se tinha outras espécies em casa e quais; em relação da saúde do gato, qual o seu índice, frequência de ida ao veterinário, problemas de saúde e se sim, quais, se era medicado, se é castrado, desparasitação externa e interna, tipo e frequência, vacinação e se foi testado para FIV e FeLV. Por fim, foram incluídas questões sobre o conhecimento da Leishmaniose, nomeadamente se os tutores conheciam a doença, se sabiam que os gatos podiam ter, se tinham conhecimento sobre como se transmite, se tinham algum cão com a doença, se alguma vez foi informado sobre a doença, se sabiam como realizar a prevenção, se o gato em questão já alguma vez tinha sido testado,

se tinha LFel diagnosticada e se tinham outros gatos que testaram positivo e, por fim, se o gato em estudo, apresentava algum dos sinais clínicos compatíveis com LFel.

2.3. Colheita e conservação de amostras biológicas

As amostras de sangue foram colhidas após autorização prévia dos tutores, através da assinatura de um termo de responsabilidade depois de devidamente informados sobre os objetivos do estudo (Anexo 2).

Foram recolhidos, a cada animal, 3 mL de sangue por venopuntura da jugular, sendo que anteriormente foi realizada assepsia do local com álcool a 70% e, nos casos em que era necessário, feita a tricotomia do local.

Posteriormente, colocou-se 2 mL de sangue num tubo com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e 1 mL num tubo seco para posterior obtenção de soro.

A partir do primeiro tubo, com o auxílio de uma pipeta, retirou-se sangue e realizaram-se 2 esfregaços que foram corados, com Giemsa ou Diff Quick, sendo, por fim, a restante amostra refrigerada a 4°C.

Relativamente ao tubo seco, procedeu-se à sua centrifugação, colheu-se, o soro, com o auxílio de uma pipeta, para um tubo *ependorf*, tendo sido seguidamente congelado a -20°C, para posterior deteção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* por IFI.

Todos estes procedimentos, foram previamente submetidos à avaliação da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, tendo sido aprovados.

2.4. Métodos de diagnóstico e respetivos protocolos

Para pesquisa de anticorpos anti- *L. infantum*, utilizou-se o método de imunofluorescência indireta (IFI) com limiares de positividade 1:40 e de 1:80.

2.4.1. Técnica de esfregaço de sangue

Para a realização do esfregaço, primeiramente, identificou-se a lâmina com o nome do animal e colocou-se uma pequena gota de sangue próximo de uma extremidade de uma lâmina limpa.

Com a ajuda de outra lâmina/lamela colocada em ângulo de 45° sobre a superfície da primeira, realizou-se um movimento para trás até estar em contacto com a gota de sangue. De seguida, fez-se a gota deslizar para a frente num movimento contínuo, rápido e suave, de modo a obter uma camada fina e uniforme.

Após secagem ao ar, os esfregaços de sangue foram corados pelo método de Giemsa. Numa primeira fase, procedeu-se à fixação com metanol durante um minuto e numa segunda cobriu-se o esfregaço com uma quantidade suficiente do corante Giemsa deixando atuar

durante um minuto. Para remover o excesso de corante, as lâminas foram passadas por água corrente, secas ao ar e armazenadas à temperatura ambiente para observação no microscópio ótico (objetiva x40, x100 e ocular x10), no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-ULisboa.

2.4.2. Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI)

Nesta técnica foi utilizado como controlo positivo o soro de um gato, proveniente da seroteca do laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV/ULisboa. Como controlo negativo foi utilizado um soro de gato sem presença de anticorpos anti-*Leishmania*.

Para a realização da IFI, utilizou-se o kit *Leishmania* IFA IgG (Laboratórios Fuller Fullerton, CA USA). As indicações do fabricante foram adaptadas aos objetivos do trabalho:

1. Para a preparação de PBS adicionar-se o produto em pó fornecido no kit a 1 litro de água destilada e agitar cuidadosamente;
2. Preparar diluições de 1:40 para todos os soros a testar.
3. Para cada amostra de soro diluído, aplicar 10 µL em cada poço da lâmina que contém promastigotas de *Leishmania infantum* fixados, incluindo nos poços dos controlos positivo e negativo;
4. Incubar durante 30 minutos a 37°C, em câmara húmida;
5. Lavar as lâminas com um jato suave de PBS. Agitar vigorosamente as lâminas de modo a eliminar o excesso de PBS. Repetir três vezes este processo de lavagem e eliminação do excesso de PBS, sem deixar que os poços sequem durante o processo;
6. Em cada poço da lâmina, adicionar 1 gota (10-15 µL) de conjugado e, em seguida, retornar a colocar as lâminas em incubação na câmara húmida, durante 30 minutos a 37°C. A incubação deve ser realizada ao abrigo da luz de modo a proteger o conjugado fotossensível;
7. Lavar as lâminas como no passo 5;
8. Adicionar 2-3 gotas de meio de montagem em cada lâmina e colocar a lamela, removendo cuidadosamente as bolhas de ar sob a lamela;
9. Observar as lâminas num microscópio de fluorescência (Olympus DP10, Modelo BX50F) numa ampliação de 400x (ocular x10 e objetiva x40), comparando cada poço com a intensidade de fluorescência e aparência dos poços dos controlos positivo e negativo. As lâminas podem ser armazenadas a 2-8°C no escuro até 24h.

2.4.3. Pesquisa de *Theileria/Babesia* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amostra suspeita foi enviada para o Laboratório de Parasitologia do INIAV para confirmação através de métodos moleculares. A extração de ADN foi efetuada com kit de extração NZY Blood gDNA Isolation™ (NZYTech, Portugal). A amplificação por PCR de parte do gene 18S rDNA foi feita de acordo com o descrito na literatura e permitiu identificar uma banda de cerca de 450 pares de bases, compatível com o descrito para as espécies de *Babesia*, *Theileria*, *Cytauxzoon* e *Hepatozoon*. A banda foi purificada com o kit NZYGelpure™ (NZYTech, Portugal) e enviada para sequenciação (Eurofins Genomics). Para análise dos dados, foi utilizado o software MEGA-X, com recurso a sequências disponibilizadas pelo GenBank.

2.4.4. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados e a apresentação dos resultados foram utilizados dois programas: Excel 2018 do Microsoft Office® (Microsoft Corporation, EUA) e o Programa R versão 4.0.2® (2020) (R Core Team, Viena, Áustria). Como métodos de estatística descritiva e como medidas estatísticas, usou-se frequências absolutas e relativas para a apresentação das variáveis estudadas em gráficos, tabelas e medidas numéricas de síntese.

Não conhecendo os valores de sensibilidade e especificidade, da técnica de IFI, os valores apresentados são de prevalência aparente com um intervalo de confiança de 95%, usando o método de Wilson.

O intervalo de Wilson consiste numa alternativa ao intervalo padrão, em que o intervalo de confiança é baseado na inversão da equação teste $np(1 - p) \geq 5$ (ou 10) que usa o erro padrão nulo $(pq)^{1/2}n^{-1/2}$ em vez do erro padrão estimado $(\hat{p}\hat{q})^{1/2}n^{-1/2}$.

De forma a testar associações estatísticas entre variáveis nominais é normalmente utilizado o Teste de independência do Qui-Quadrado (χ^2) ou de Pearson, contudo este não é válido em amostras muito pequenas, isto é, nas tabelas de contingência o valor esperado numa célula possa ser 0 ou quando mais de 25% das células tem um valor esperado inferior a 5. Nestes casos, utiliza-se o Teste Exato de Fisher, que não tem essas restrições. Assim, foi assumido um nível de significância (p) inferior a 0,05 ($p < 0,05$), para um intervalo de confiança (IC) de 95%, rejeitando-se a hipótese nula (não existe associação entre as duas variáveis) (Petrie & Watson, 2013).

Odds-ratio (razão de possibilidades) mede o grau de associação das variáveis, isto é, a razão da probabilidade de um evento ocorrer, em relação à probabilidade desse mesmo evento não ocorrer (Thrusfield, 2018).

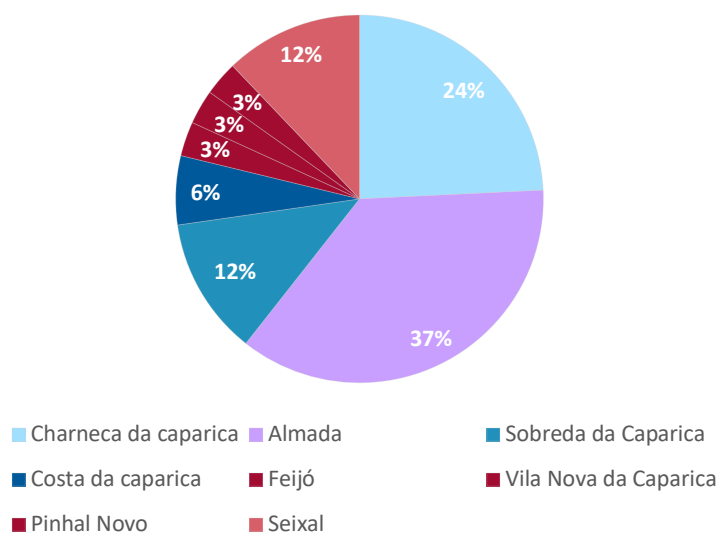
3. Resultados

3.1. Caracterização dos animais da amostra

3.1.1. Localidade onde os gatos habitam

A localidade onde habitavam mais gatos presentes no estudo, foi a cidade de Almada, com 13 gatos (38%), seguida da Charneca da Caparica com 8 gatos (24%), sendo que a Sobreda da Caparica e Seixal apresentaram 4 gatos cada uma (12%), Costa da Caparica 2 gatos (6%) e por fim, Feijó, Vila Nova da Caparica e Pinhal novo, apresentaram 1 gato cada uma (3%) (Gráfico 1).

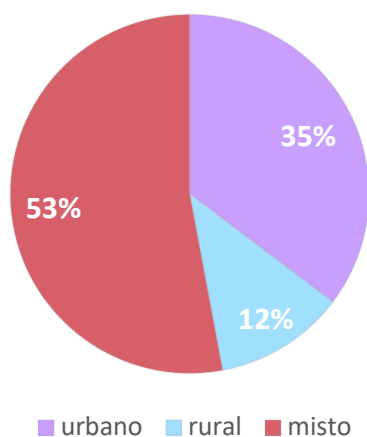
Gráfico 1- Distribuição dos gatos por localidade (n=34)



3.1.2. Meio onde vivem

Relativamente ao habitat dos gatos em estudo, 18 (53%) habitavam num meio misto, em que a casa apresentava vegetação exterior, 12 gatos (35%) vivam num meio urbano, sem qualquer vegetação exterior, nem parques verdes por perto, e, por fim, 4 gatos (12%) viviam num meio rural (Gráfico 2).

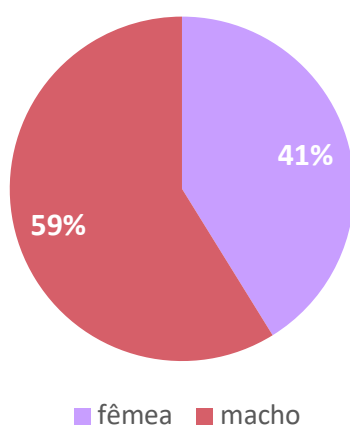
Gráfico 2- Distribuição dos gatos pelo meio onde vivem (n=34)



3.1.3. Sexo

O número de machos foi superior ao número de fêmeas, 20 (59%) e 14 (41%), respectivamente (Gráfico 3).

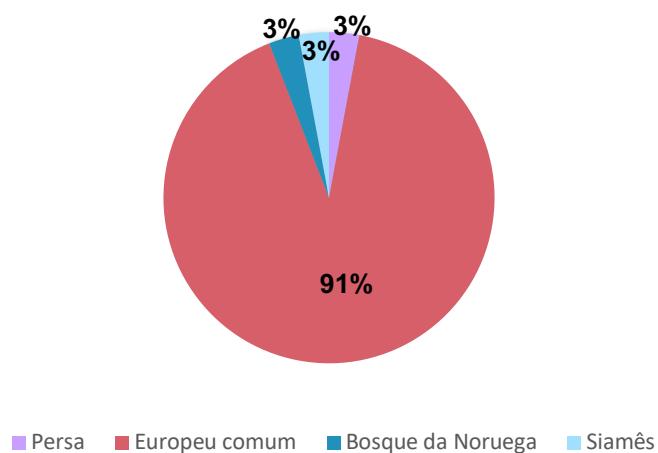
Gráfico 3- Distribuição dos gatos por sexo (n=34)



3.1.4. Raça

Relativamente à raça, 31 gatos eram Europeu Comum, um era Persa, um era Siamês e outros era Bosque da Noruega (Gráfico 4).

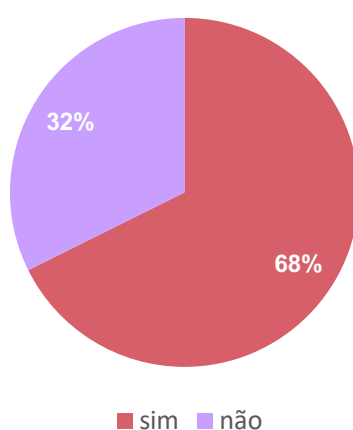
Gráfico 4-Distribuição dos gatos por raça (n=34)



3.1.5. Acesso à rua

No que diz respeito ao acesso à rua, 23 animais (68%) tinha acesso à rua dos quais 14 (61%) tem acesso livre todo o dia, enquanto que 11 gatos (32%) estão exclusivamente dentro de casa (Gráfico 5).

Gráfico 5- Distribuição dos gatos por acesso à rua (n=34)



3.1.6. Resultados IFI

Através da técnica de imunofluorescência indireta (Figura 14), obteve-se uma proporção de gatos seropositivos a *L. Infantum* de 53% (18/34) considerando o limiar de positividade de 1:40 e 32,4% (11/34) com o limiar de positividade de 1:80 (Anexo 3).

Diversos animais apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* sem, contudo, exibirem sinais clínicos. Como não foi possível voltar a avaliar esses animais no sentido de verificar se existia uma infecção ativa ou se os resultados traduziram somente um contacto anterior com o parasita que, entretanto, terá sido eliminado, passaremos a designar estes animais por seropositivos.

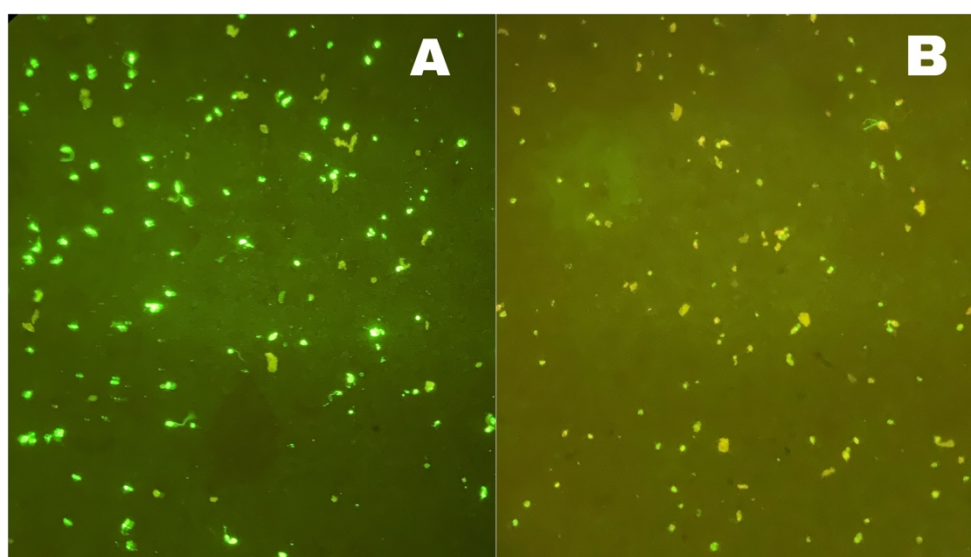


Figura 14- Aspeto de amostra positiva (A) e amostra negativa (B) para *L. infantum* pela técnica de IFI, na diluição 1:80. (Foto original)

3.1.7. Resultados observação de esfregaços

Relativamente à presença de outros hemoparasitas nos animais em estudo, através da visualização dos esfregaços de sangue ao microscópio ótico não foi detetada leishmaniose. Contudo, foi possível identificar micoplasma em 22 gatos (65%), sendo que em 12 gatos não foi detetado (35%) (Gráfico 6). Dos 22 gatos positivos a *Mycoplasma* (Figura 15), 8 eram seropositivos a *Leishmania* spp. (Anexo 4).

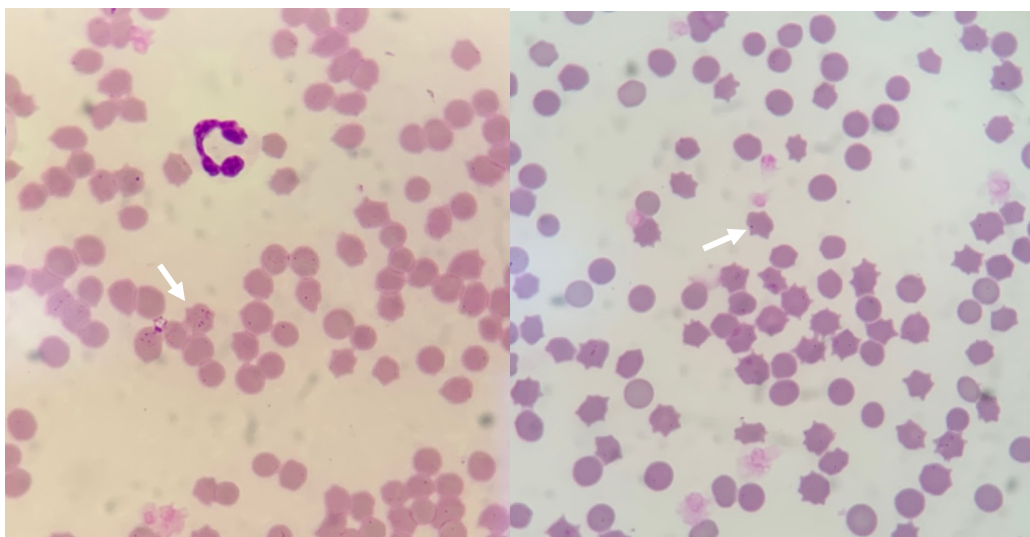
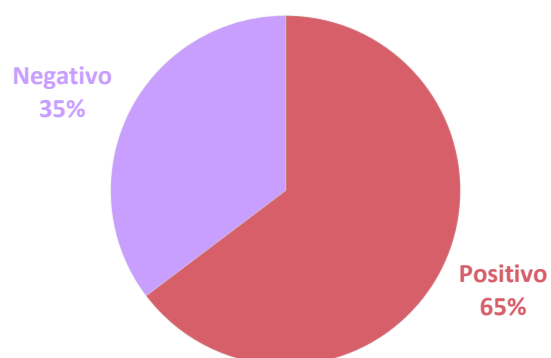


Figura 15- Presença de formas de *Mycoplasma* spp. (setas brancas) nos esfregaços de sangue realizados dos gatos estudados, utilizando coloração Giemsa. (Foto original)

Gráfico 6- Presença de *Mycoplasma* spp. nos esfregaços de sangue (n=34)



3.1.8. Resultados do diagnóstico de *Theileria/Babesia* por PCR e posterior sequenciação

Através da sequenciação de ADN, a partir de uma amostra de sangue, realizada no INIAV, a amostra nº 10 proveniente de um gato com PIF revelou-se positiva para *Hepatozoon felis* (Gráfico 7).

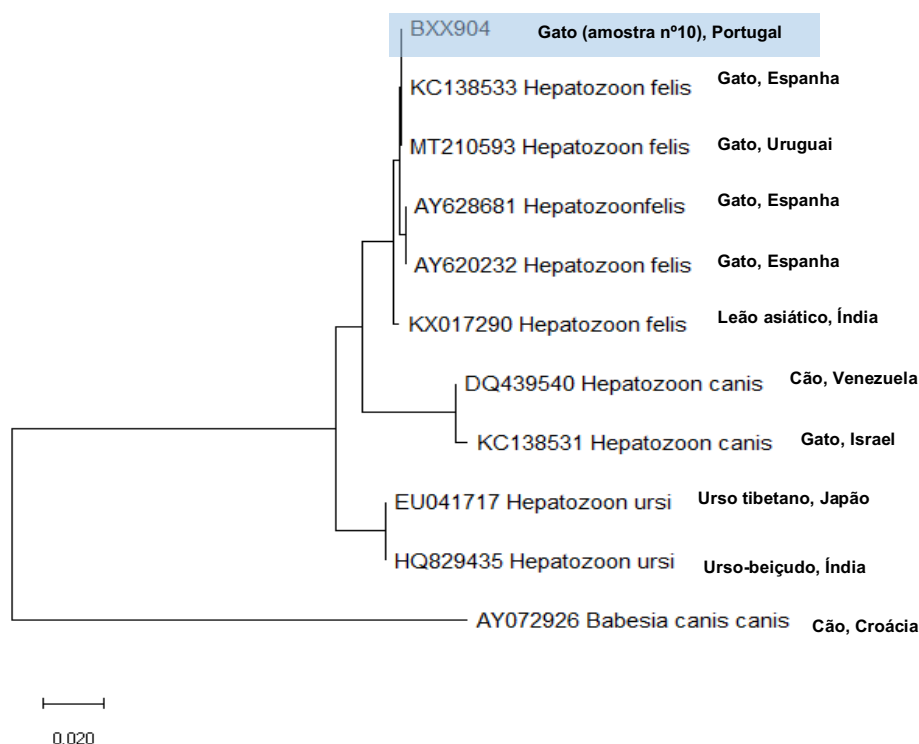


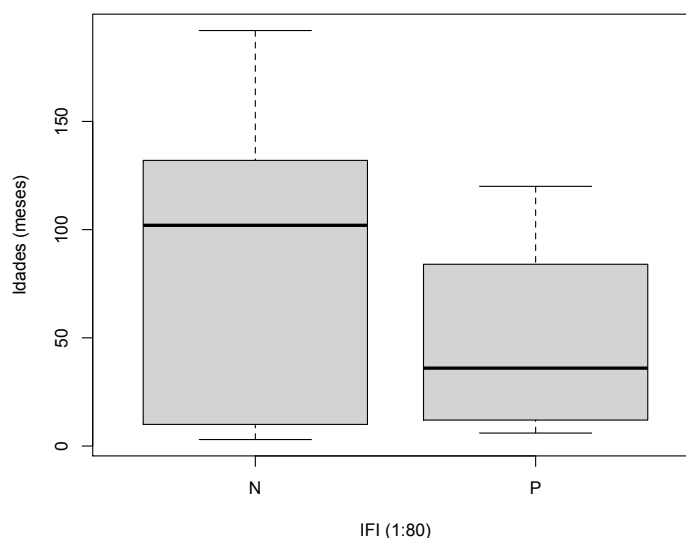
Gráfico 7- Árvore filogenética do gene 18S rRNA gene de sequências de *Hepatozoon* disponíveis no GenBank® (método de máxima verosimelhança). Amostra de gato identificada neste estudo (a azul). Como outgroup foi selecionada uma sequência de *Babesia canis*.

1. Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
2. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549

3.1.9. Idade

Relativamente à idade o número de gatos estudados foi de 32 (n=32), uma vez que em 2 gatos a informação não estava disponível. Deste modo, a média das idades dos gatos seropositivos foi de aproximadamente 7 anos, enquanto que a média das idades dos gatos seronegativos foi de, aproximadamente, 4 anos. Nos seropositivos, a idade mínima foi de 3 meses e a idade máxima de 16 anos, sendo que a mediana foi de 8 anos e 6 meses. Nos gatos seronegativos a *L. infantum*, a idade mínima foi de 6 meses, a máxima de 10 anos, sendo que apresentaram uma mediana de 3 anos (Gráfico 8).

Gráfico 8- Distribuição em *box-plot* da idade dos animais seropositivos (P) e seronegativos (N) (n=32).



3.1.10. Presença de sinais clínicos e doenças em gatos seropositivos a *L. infantum*

De acordo com o historial clínico, (Anexo 5) dos animais positivos a *L. infantum*, um foi diagnosticado com hiperadrenocorticismismo e outro com diabetes *mellitus*.

Relativamente aos sinais clínicos presentes nos animais seropositivos a *Leishmania* spp, 4 animais apresentavam diarreia, 4 apresentavam vômito, 3 animais apresentavam perda de peso, disúria esteve presente num animal, assim como tosse (Tabela 4)

Tabela 4- Sinais clínicos presentes nos gatos seropositivos a *L. infantum* (n=16)

Sinais Clínicos	Nº. de seropositivos a <i>L. infantum</i>
Diarreia	4
Desidratação	1
Disúria	1
Perda de peso	3
Tosse	1
Vômito	4

3.1.11. Presença de sinais clínicos compatíveis com LFel

Do total dos animais presentes no estudo, 5 gatos apresentavam sinais clínicos compatíveis com infecção por *L. infantum*, tais como: nódulos, emagrecimento sem causa aparente, feridas de difícil cicatrização e descamação cutânea. Destes, apenas 2 foram seropositivos a *L. infantum*, sendo que, um gato apresentava feridas/úlceras nas narinas, outro gengivite e ambos apresentavam descamação. Os restantes gatos que apresentavam algum tipo de sinal clínico tiveram resultado negativo (Anexo 5).

3.1.12. Possíveis associações de fatores de risco

Neste estudo, não foi encontrada nenhuma associação entre seropositivo a *L. infantum* e as variáveis estudadas, exceto para a variável vacinação contra Panleucopénia felina, Calicivírus e Herpesvírus e seropositivos a *L. infantum*, que apresentou um resultado estatisticamente significativo. Assim, a ausência de vacinação apresentou um valor de significância de $p = 0.01$ e OR= 7,4 com um IC de 95%, [1,12; 63,45] (Tabela 5). Independentemente do tipo de vacina, os gatos seropositivos surgiram mais dentro dos gatos que não estavam vacinados contra nenhum agente. No entanto, esta observação carece de um estudo mais alargado num maior número de gatos de diferentes faixas etárias.

De acordo com a Tabela 5, é possível verificar que, relativamente ao sexo, o número de seropositivos a *L. infantum* é maior nas fêmeas 42,9% (6/14) do que nos machos 25% (5/20). A maioria dos animais tinha acesso à rua 67,6% (23/34) dos quais 26,1% foram seropositivos. Dos gatos que viviam exclusivamente dentro de casa, 45,5% eram seropositivos *L. infantum* (5/11). Dos gatos que coabitavam com outros gatos, 31,8% (7/22) eram seropositivos a *L. infantum* e dos que coabitavam com outras espécies, nomeadamente cães, 31,6% (6/19) apresentavam anticorpos contra este protozoário.

Tabela 5- Resultados estatísticos obtidos para os gatos testados

Variável		n	seropositivos	%	p	OR [IC 95%]
Sexo						
	macho	20	5	25,0%	0.273	0.455 [0,08; 2,44]
	fêmea	14	6	42,9%		
Acesso à rua						
	sim	23	6	26,1%	0,258	0.435 [0,07; 2,52]
	não	11	5	45,5%		
Coabitação com outros gatos						
	sim	22	7	31,8%	0,928	0,935 [0,17; 5,74]
	não	12	4	33,3%		
Coabitação com outra espécie (cão)						
	sim	19	6	31,6%	0,914	0,925 [0,17; 5,07]
	não	15	5	33,3%		
Problema de saúde						
	sim	14	4	28,6%	0,693	0,749 [0,12; 4,01]
	não	20	7	35%		
Desparasitação externa						
	sim	30	10	33,3%	0,738	1,483 [0,10; 86,47]
	não	4	1	25%		
Vacinação atualizada (Panleucopénia felina, Calicivirus, Herpesvírus)						
	sim	9	6	66,7%	0,01	7,401 [1,12; 63,45]
	não	25	5	20%		

4. Discussão

A LFel causada por *L. infantum* é uma doença felina emergente cada vez mais frequente nas regiões endêmicas. Nos últimos anos, têm sido descritos cada vez mais casos e vários estudos de investigação foram publicados (Spada et al. 2020).

Na última década, diversos estudos realizados em gatos, demonstraram que a bacia do Mediterrâneo, região endêmica de leishmaniose canina, observaram-se seroprevalências entre os 0% e os 59% em felinos (Miró et al. 2014; Pennisi et al. 2013).

Em regiões endêmicas, como os países mediterrânicos, a forma subclínica de *L. infantum* felina é comum enquanto, que a doença clínica é relativamente menos comum (Spada et al. 2020).

De acordo com o conhecimento atual, os gatos podem desempenhar um papel como hospedeiro reservatório adicional de *L. infantum* e transmitir o protozoário a flebótomos. Pela perspetiva de “One Health”, devem ser implementadas medidas preventivas nesta espécie, com base nos dados epidemiológicos (Pennisi and Persichetti 2018; Spada et al. 2020).

Num estudo realizado em Itália por Iatta et al. (2019), foi estudada a seroprevalência de *Leishmania* spp. no Norte, Centro e Sul do país. O sul de Itália foi o que apresentou maior seroprevalência (2,8%), em comparação com o Norte (1,3%) e Centro (1,1%). Dados de seroprevalência mais elevados em gatos foram descritos em regiões endêmicas da bacia do Mediterrâneo para CanL, como no sul de Espanha (28,3%) (Martin-Sánchez et al. 2007), centro (16,3%) (Vitae et al. 2005) e sul da Itália (25,8%) (Otranto et al. 2017) e Turquia (15,2%) (Can et al. 2016), o que demonstra que em áreas onde CanL é endêmica, os gatos têm maior probabilidade de estar expostos a *L. infantum* em comparação com aquelas onde a proporção de CanL é baixa (Otranto et al. 2017). Contudo, Spada et al. (2020), obtiveram no seu estudo em Lombardia, uma região não endêmica de CanL, uma seroprevalência de 2,9% em gatos, utilizando um *cut-off* de 1:80.

No presente estudo realizado na Península de Setúbal a seroprevalência de infeção por *Leishmania* spp. em gatos, obtida através da técnica de IFI, foi de 53% (18/34 gatos) considerando o limiar de positividade de 1:40 e 32,4% (11/34 gatos) com um limiar de positividade de 1:80. Até à data este estudo foi o que obteve a maior seroprevalência em Portugal tanto no limiar de positividade de 1:40, como de 1:80. Os únicos estudos que tinham sido realizados, na Área Metropolitana de Lisboa, com seroprevalências altas foram os de Maia et al. (2008) com 20% (4/20), Garrido (2012) com 12,5% (5/40), utilizando um limiar de positividade de 1:40 e Marques et al. (2013) que obtiveram 17,95% (7/39), utilizando um limiar de positividade de 1:80. Em contraste, Duarte et al. (2010), que testaram 180 gatos na Área Metropolitana de Lisboa, obtiveram, utilizando um limiar de positividade de 1:40, apenas um resultado positivo com uma seroprevalência de 0.6%. Ainda na mesma área, Gomes (2015) e Teives (2015) obtiveram resultados negativos, numa amostra de 47 gatos utilizando um

limiar de positividade de 1:80 e numa amostra de 40 gatos utilizando um limiar de positividade de 1:40, respetivamente.

Na região Sul do país, Pires (2016) realizou um estudo na Ilha de Faro, com resultados negativos, numa população de 123 gatos, utilizando um limiar de positividade de 1:10. Maia et al. (2015) numa amostra de 271 gatos, detetaram anticorpos anti-*Leishmania* em 10 gatos (3,7%) através do teste de aglutinação direta com um limiar de 1:100.

No Norte do país, em Trás-os-Montes e Alto Douro, Cardoso et al. (2010) obtiveram uma seroprevalência de 2,8% numa amostra de 316 gatos, utilizando TAD e ELISA. Por outro lado, Garrido (2012) no distrito de Viseu, obteve uma seroprevalência mais elevada de 25% (10/40), utilizando IFI, em diluição de 1:40.

A elevada seroprevalência de gatos infetados no Centro e Norte do país, em comparação com o Sul, sugere que os gatos estão mais expostos a *L. infantum* nestas regiões do país.

De facto, a discrepância de resultados na mesma região e entre regiões do país diferentes, sugere que a taxa de infeção de *Leishmania* spp. poderá ser dinâmica ao longo do tempo, dependendo da distribuição dos vetores e do número de hospedeiros vertebrados infetados (Maia et al. 2014). Contudo outros fatores poderão também desempenhar um papel importante, tais como, o estado de saúde dos gatos, acesso ao exterior, bem como as diferenças nas técnicas serológicas e como são executadas, e ainda, os limiares de positividade utilizados (Cardoso et al. 2010).

De acordo com os dados, anteriormente apresentados de seroprevalência de infeção por *Leishmania*, é visível que o uso de diferentes metodologias de diagnóstico e valores de corte, representam um fator limitante para comparação de dados (Iatta et al. 2020). No nosso estudo, através da técnica de imunofluorescência indireta, o limiar de positividade 1:40 apresentou maior proporção de gatos seropositivos a *Leishmania* spp. (53%) do que no limiar de positividade de 1:80 (32,4%).

Os nossos resultados estão de acordo com os de Iatta et al. (2019) que observaram que, a seroprevalência a *L. infantum*, detetada por IFI, era maior num limiar de positividade de 1:40 (25,8% e 28,3%) (Otranto et al. 2017; Martín-Sánchez et al. 2007), do que num limiar de positividade de: 1:64 (0,7%) (Silaghi et al. 2014), 1:100 (3,2%) (Miró et al. 2014) e a 1:80 (3,3%) (Iatta et al. 2019).

Todos os valores de seroprevalências até agora mencionados basearam-se na deteção de anticorpos anti-*Leishmania* através de diversas técnicas serológicas porém, outros estudos, nos quais foi pesquisado o ADN do parasita como o de Maia et al. (2014), realizado numa população de 649 gatos, evidenciou, através de amostras de sangue, a presença de ADN de *Leishmania*, em 9,9% (64) de gatos, utilizando a técnica de PCR. Este resultado, foi a maior proporção de gatos seropositivos a *Leishmania* spp. no Algarve embora não seja

comparável com os estudos serológicos tendo em conta o diferente tipo de amostra e de técnica de diagnóstico.

Spada et al. (2020) descreveram que, apesar de o método IFI ser considerado a técnica de referência pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) (Persichetti et al. 2017), a identificação de formas amastigotas de *Leishmania* em amostras por punção aspirativa de medula óssea, baço e linfonodos apresenta maior especificidade e é considerada a técnica “gold standard” para o diagnóstico de infeção por *L. infantum*.

Em gatos, na IFI, recomenda-se um *cut-off* 1:80, uma vez que, nesta técnica serológica, os níveis de anticorpos séricos para o antígeno de *Leishmania* podem variar desde níveis baixos até altos, em casos clínicos de LFel (Pennisi et al. 2015a). Gatos doentes com quadro clínico compatível com infeção por *L. infantum* mas negativos pela IFI, devem realizar outros testes sorológicos, por ex. por ELISA, e/ou outros testes complementares de diagnóstico, como exames histológicos de lesões mucosas ou mucocutâneas ou diagnóstico molecular por PCR das mesmas amostras.

Em áreas endémicas para *Trypanosoma* spp. ou outras espécies de *Leishmania*, deve-se ter atenção à possibilidade de ocorrerem reações cruzadas com *L. infantum*, devendo este facto ser tomado em consideração para a interpretação dos testes sorológicos (Persichetti et al, 2017).

Sabe-se ainda que, a técnica ELISA, é menos utilizada em gatos, mas apresenta ser mais sensível do que a IFI (Pennisi et al, 2015a), sendo assim, mais um método de diagnóstico a ponderar, por parte dos veterinários, aquando da realização do diagnóstico em gatos.

Relativamente à presença de outros hemoparasitas, detetados no presente estudo, verificou-se que 65% (22/34) dos gatos estavam infetados com *Mycoplasma*. Destes, 8 estavam seropositivos, em simultâneo com *Leishmania* spp. num *cut-off* de 1:80, pela técnica de IFI.

Os dados de prevalência global sobre hemoplasmas felinos variam de 6,5% a 38,5 (Marcondes et al. 2018). Em Portugal, Duarte et al. (2014) descreveram uma proporção de infeção por hemoplasmas de 27,1% (64/236) em gatos de Lisboa e sul de Portugal, inferior à anteriormente descrita por Vilhena et al. (2013), que demonstraram uma proporção de 43,43% (139/320) em gatos domésticos no Centro e Norte do país. Attipa et al. (2017), descreveram, pela primeira vez, em gatos, a associação de *L. infantum* e de “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (CMt), concluindo que gatos infetados com *Leishmania* spp. tem sete vezes maior probabilidade de serem CMt positivos.

No que se refere a outros hemoparasitas, no presente estudo, a presença de *Hepatozoon felis* foi detetada, através de PCR seguida de sequenciação, num único gato. Nos estudos de Maia et al. (2014), foi detetado o ADN de *Hepatozoon* spp. através de métodos de PCR no sangue de 8,6% (56/649) dos gatos do sul do país. Vilhena et al. (2013) que,

também através de PCR, observaram a presença de *Hepatozoon felis* em 15,6% (50/320) dos gatos do Norte e Centro do país.

Segundo Basso et al. (2019), num estudo realizado na Europa Central, referiram que até à data, muito poucos casos clínicos de infeção por *Hepatozoon* em gatos foram descritos e os protocolos de tratamento não estão claramente definidos. Para além disso, os estudos da proporção de infeções por *Hepatozoon* em gatos na Europa são igualmente escassos.

Num estudo de Attipa et al. (2017), realizado no Chipre, 37,9% (66/174) dos gatos testados, foram positivos para *Hepatozoon* spp.. No sul da Itália, ADN de *Hepatozoon* spp. foi detetado em 5,1% (10/196) dos gatos analisados, a sequenciação adicional confirmou a presença de todas as três espécies *Hepatozoon* descritas que afetam gatos domésticos: *H. felis* (n=8), *H. canis* (n=1) e *H. silvestris* (n=1) (Giannelli et al. 2017). Em Espanha, ADN de *H. felis* (n=9) e *H. canis* (n=1) foram detetados por PCR / sequenciação no sangue de 1,6% (10/644) de gatos em Madrid (Díaz-Regañón et al. 2017).

As situações de imunossupressão e as coinfeções com outros agentes patogénicos são consideradas como contribuintes para a gravidade da hepatozoonose felina (Kegler et al. 2018). Vários casos descritos de infeções felinas por *Hepatozoon* spp., estão associados a coinfeções por outros agentes patogénicos, incluindo os vírus imunossupressores FIV e FeLV, e da Panleucopénia Felina, *Leishmania* spp., *Babesia* spp., *Cytauxzoon* spp. e micoplasma hemotrópico (Basso et al. 2019). No nosso estudo, o único gato com *Hepatozoon* spp., apresentava também Peritonite Infecciosa Felina (PIF). Devido à escassez de informação sobre este parasita, desde o seu ciclo de vida, como a sua distribuição geográfica, patogenia e tratamento em gatos, seria importante estudos futuros de modo a fornecerem mais evidências sobre *Hepatozoon* spp. em gatos domésticos (Basso et al. 2019).

No que diz respeito à discussão dos dados recolhidos através do inquérito respondido pelos tutores, nomeadamente no que se refere ao acesso dos animais ao exterior, neste estudo grande parte dos gatos tinha acesso ao exterior (68%), sendo que, estes gatos estavam mais expostos à picada dos flebótomos, o que com o tempo, poderia resultar num maior risco de infeção por *L. infantum* tal como sugerido por Iatta et al. (2019). Este facto, foi comprovado pelo estudo de Pereira et al. (2019) realizado em Portugal, no centro (Coimbra, Guarda) Lisboa (Lisboa e Setúbal) e sul, que descreveram pela primeira vez, a resposta de anticorpos felinos contra saliva de *Phlebotomus perniciosus* (o principal vetor de *L. infantum* no Mediterrâneo), em gatos naturalmente expostos aos flebótomos. Como resultados, obtiveram a presença de anticorpos contra *P. perniciosus* em 47,7% dos soros, demonstrando que os felinos são frequentemente picados por este inseto.

Dos animais que apresentaram anticorpos anti-*Leishmania*, 54,5% (6/11) eram fêmeas. A média das idades dos gatos positivos foi de aproximadamente 7 anos tendo a idade mínima sido 3 meses e a idade máxima 16 anos. De facto, é de realçar que um gato com

apenas 3 meses de idade tenha sido seropositivo a *L. infantum*. Apesar de não haver mais informação sobre este gato, de 3 meses de idade, que justifique a seropositividade da amostra, duas hipóteses podem ser colocadas: este animal que nasceu em Setembro poderá ter sido infectado na época dos flebótomos (Março a Outubro) ou poderá ter ocorrido uma transmissão vertical que entretanto não foi possível avaliar.

Estes dados vão ao encontro de estudos realizados em gatos, em que se confirma a predisposição de infecção por *Leishmania* nas fêmeas e uma idade superior a 2 anos (Pennisi, 2002; Garrido 2012; Maia et al. 2015). Contudo, existem autores que descreveram não haver qualquer tipo de relação entre a presença de infecção e o sexo dos animais (Solano-Gallego et al. 2007; Tabar et al. 2008; Pennisi et al. 2013; Miró 2014).

Relativamente à predisposição racial, 91% (31/34) dos gatos pertenciam à raça Europeu Comum. Apesar de Tabar et al. (2008) e Cardoso et al. (2010), terem realizado estudos onde não verificaram predisposição racial, Navarro et al. (2010) verificaram que a raça Europeu Comum era a mais afetada. Além disso, LFel nunca foi relatada em gatos com *pedigree*, de modo que no momento não há dados apoiando uma suscetibilidade genética à doença em alguns gatos. Pennisi e Persichetti (2018) descrevem que, a comparação do histórico genético de gatos infectados com seu estado clínico, pode elucidar mecanismos de suscetibilidade de felinos hospedeiros que vão além do fenótipo somático de gatos domésticos de pêlo curto (*Felis silvestris domesticus*) uma vez que, estes animais passaram por milhares de anos de seleção natural em áreas endêmicas.

No presente estudo, de acordo com a história pregressa, verificou-se que os animais seropositivos a *Leishmania* spp. apresentavam doenças concomitantes: um gato tinha diabetes *mellitus* e outro hiperadrenocorticismismo. Relativamente a sinais clínicos inespecíficos de infecção por *L. infantum*, dos gatos positivos: 4 apresentavam vômito, 4 diarreia, 3 perda de peso, 1 desidratação, 1 disúria e 1 tosse. Segundo Pennisi et al. (2015a) sinais inespecíficos, como perda de peso, redução do apetite, desidratação, icterícia, caquexia, febre, vômito, diarreia e letargia, também foram descritos em gatos infectados. A implicação de *Leishmania* spp. como causa de alguns desses sinais clínicos tem sido associada à presença do parasita em exames citológicos ou histopatológicos de fígado, baço, nódulos linfáticos, estômago, intestino grosso, rim, mucosa oral, exsudado nasal e tecidos oculares. No entanto, esta infecção é comumente associada a uma fraca imunidade com origem em infecções retrovirais (FIV e FeLV), tratamentos imunossupressores e/ou doenças debilitantes concomitantes, como neoplasia maligna ou diabetes *mellitus* (Pennisi and Persichetti 2018).

Tal como na leishmaniose canina, na infecção por *L. infantum* podem surgir doenças concomitantes ou coinfeções que podem influenciar a apresentação clínica e o prognóstico (Pennisi et al. 2015a). A relação causa-efeito entre vários fatores etiológicos e patogénicos

nem sempre é fácil de estabelecer, pelo que seria importante em estudos futuros, avaliar essa mesma relação.

De acordo com os dados obtidos nos inquéritos e pelo historial clínico, 5 gatos apresentavam sinais clínicos compatíveis com LFel, tais como: nódulos, emagrecimento sem causa aparente, feridas de difícil cicatrização e descamação cutânea. Contudo, apenas 2 seropositivos a *L. infantum* apresentavam descamação, sendo que, um ainda evidenciava gengivite e outras úlceras nas narinas. Sobre lesões nasais na LFel, Leal et al. (2018), descreveram um caso de um felino de 12 anos, macho, castrado, submetido a rinoscopia devido a dispneia inspiratória e estertor. O animal tinha apetite normal, boa condição física, porém, na história pregressa, foram referidos sinais dermatológicos recorrentes, nomeadamente alopecia ventral episódica e escoriações pruriginosas controlados com corticosteróides tópicos e selamectina. Nas análises bioquímicas surgiu hiperproteinémia moderada. Foi realizada uma rinoscopia, que mostrou uma mucosa nasofaríngea multinodular e rinite crónica. Através de histopatologia, após biópsia nasal e nasofaríngea, foi possível verificar um infiltrado de macrófagos que continham formas parasitárias intracelulares compatíveis com formas amastigotas de *Leishmania* spp.. A PCR realizada no tecido nasal, foi positiva para *Leishmania*, confirmando o diagnóstico de rinite granulomatosa secundária a *L. infantum*. Também a análise a dois nódulos que surgiram posteriormente, revelaram formas amastigotas de *Leishmania*.

Este caso, demonstra a importância de não excluir a LFel na lista de diagnósticos diferenciais, uma vez que, como é descrito em CanL, as lesões cutâneas ou mucocutâneas são a maior razão da ida ao veterinário e um achado no exame físico em gatos com leishmaniose (Pennisi and Persichetti 2018). Além disso, reforça também a ideia de que a rinite granulomatosa secundária à leishmaniose deve ser incluída também nos diagnósticos diferenciais de rinite crónica obstrutiva em gatos, principalmente em regiões endémicas. Este caso também demonstra as dificuldades de gestão terapêutica da LFel, descrevendo o uso alternativo de miltefosina e N-AHCC quando o alopurinol parecia ter induzido uma erupção cutânea e de o animal ter manifestado insuficiência renal após terapêutica com antimoníato de meglumina (Leal et al. 2018).

Além deste caso, Basso et al. (2016), tinham descrito um outro caso de LFel onde foi obtida a cura clínica. Neste estudo, um gato doméstico de 2 anos de idade apresentava febre e lesões cutâneas ulcerativas e nodulares, tendo efetuado anteriormente um tratamento para a piodermatite sem melhoria clínica. Após diagnóstico molecular e por citologia dos nódulos cutâneos, foram detetados DNA e amastigotas de *Leishmania* respetivamente. O tratamento inicial foi realizado com alopurinol em monoterapia, com pouca melhoria clínica, tendo sido adicionado posteriormente antimoníato de meglumina, durante 30 dias. No seguimento do

caso, após 24 meses de ter terminado o tratamento, não houve recidivas, mostrando que a terapia foi segura neste caso e não ocorreram efeitos secundários.

Estes casos clínicos, apoiam o facto da importância da prevenção através do uso inseticidas tópicos com atividade repelente para flebótomos, como acontece nos cães (Pennisi et al. 2015a).

Neste sentido, Brianti et al. (2017) demonstraram que a aplicação de uma combinação de 10% de imidaclopride com 4,5% de flumetrina, sob a forma de coleira, reduziu o risco de infeção por *L. infantum* em gatos. Esta combinação até agora, é a única estratégia preventiva da infeção felina por *Leishmania* comprovada em condições naturais. Este fármaco constitui uma ferramenta fundamental para a redução do risco de infeção por *Leishmania*/LFel contribuindo para a prevenção em outras espécies animais como cães e humanos.

Em relação aos cuidados médico-veterinários, os resultados obtidos após a avaliação do inquérito distribuído aos tutores no decurso do presente estudo, permitiram verificar que 53% dos tutores só levavam os gatos ao médico Veterinário na presença de sinais de doença não realizando, assim, na maioria das vezes vacinações e desparasitações. Para além disso, nenhum realizava a desparasitação externa com coleiras com a combinação de 10% de imidacloprida e 4,5% de flumetrina o que favorecia a infeção por *Leishmania* e os riscos de infeção decorrentes quer dos flebótomos quer dos vertebrados.

5. Conclusão

No presente estudo realizado em concelhos que integram a Península de Setúbal observou-se uma seroprevalência de *Leishmania* spp. de 53% (18/34) dos gatos considerando o limiar de positividade de 1:40 e de 32,4% (11/34) dos gatos com um limiar de positividade de 1:80.

A raça mais afetada foi a Europeu comum com 91% (31/34) dos gatos.

De acordo com o sexo dos animais dos animais seropositivos a *L. infantum*, as fêmeas apresentaram uma maior proporção 54,5% (6/11).

A média de idades dos gatos seropositivos a *L. infantum* foi de 7 anos.

Verificou-se unicamente associação estatística entre as variáveis “não vacinado contra Panleucopénia felina, Calicivirus, Herpesvirus” e “deteção de anticorpos anti-*Leishmania*” ainda que seja recomendada prudência nesta observação considerando a dimensão da amostra.

Em relação a outros hemoparasitas, verificou-se a presença de uma proporção de infeção de 65% por *Mycoplasma* spp., dos quais, 8 foram seropositivos, em simultâneo com *Leishmania* spp. num *cut-off* de 1:80, pela técnica de IFI, e um gato encontrava-se infetado com *Hepatozoon felis*.

Através deste estudo, foi notória a desinformação relativamente à Leishmaniose em gatos, não só dos tutores como também de alguns médicos veterinários, pelo que a divulgação desta doença, através de ações de formação, será fulcral. É fundamental que os veterinários que atuem em áreas endémicas estejam cientes da suscetibilidade dos gatos à infeção por *L. infantum*, de modo a incluir adequadamente a LFel no diagnóstico diferencial e proporem medidas preventivas para os gatos em risco.

Por fim, como já referido, a Leishmaniose é uma zoonose, e ao reduzir-se a infeção nos animais promove-se a saúde pública, no contexto de “Uma Só Saúde” (“One Health”).

Bibliografia

Afonso MO, Alves-Pires C. 2008. Capítulo II: Bioecologia dos vetores. In Santos-Gomes GM, Pereira da Fonseca, I, editores. Leishmaniose canina. 1ª edição. Lisboa: Chaves; p. 27-39.

Alexandre-Pires GM, Correia JJ. 2008. Capítulo IV: Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In Santos-Gomes GM, Pereira da Fonseca, I, editores. Leishmaniose canina. 1ª edição. Lisboa: Chaves; p. 53-68.

Alho AM, Silva J, Fonseca MJ, Santos, F, Nunes C, Carvalho LM, Rodrigues M, Cardoso L. 2016. First report of *Cytauxzoon* sp. infection in a domestic cat from Portugal. *Parasites & Vectors* 9, 220.

Asfaram S, Fakhar M, Teshnizi SH. 2019. Is the cat na importante resevoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 25:e20190012.

Associação de desenvolvimento regional da Península de Setúbal (ADREPES). [Internet]. [acedido a 19 de agosto de 2020]. <http://www.adrepes.pt/territorio>.

Attipa C, Neofytou K, Yiapanis C, Martínez-Orellana P, Baneth G, Nachum-Biala Y, Brooks-Brownlie H, Solano-Gallego L, Tasker S. 2017. Follow-up monitoring in a cat with leishmaniosis and coinfections with *Hepatozoon felis* and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', *Journal of feline medicine and surgery open reports*, 3: 1–6.

Baneth G, Yasur-Landau D, Gilad M, Nachum-Biala Y. 2017. Canine leishmaniosis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: comparative findings and serology. *Parasites & Vectors* 10, 113. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2050-7>.

Barker E, Tasker S. 2013. Haemoplasmas: Lessons learnt from cats. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(4), 184–192.

Basso MA, Marques C, Santos M, Duarte A, Pissarra H, Carreira L, Gomes L, Valério-Bolas A, Tavares L, Santos-Gomes G, Fonseca IP. 2016. Successful treatment of feline leishmaniosis using a combination of allopurinol and N-methyl-glucamine antimoniate. *Journal Feline Medicine and Surgery, Open reports*: 1-7.

Basso W, Görner D, Globokar M, Keidel A, Pantchev N. 2019. First autochthonous case of clinical *Hepatozoon felis* infection in a domestic cat in Central Europe. *Parasitology International* 72: 101945.

Beugnet, F., Halos, L., Guillot, J. (2018). Textbook of Clinical Parasitology in dogs and cats. Servet editorial - Grupo Asís Biomedica, S.L.

Brianti E, Celi N, Napoli E, Abbate JM, Arfuso F, Gaglio G, Iatta R, Giannetto S, Gramiccia M, Otranto D. 2019. Treatment and long-term follow-up of a cat with leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, Short Report: 1-7.

Brianti E, Falsone L, Napoli E, Gaglio G, Giannetto S, Pennisi MG, Priolo V, Latrofa MS, Tarallo V D, Basano FS, Nazzari R, Deuster K, Pollmeier M, Gulotta L, Colella V, Dantas-Torres F, Capelli G, Otranto D. 2017. Prevention of feline leishmaniosis with an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar. *Parasites & Vectors*: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2258-6>.

Brown LD, Cai TT, DasGupta A. 2001. Interval Estimation for a Binomial Proportion. *Institute of mathematical Statistics. Stastitical Science* vol.16, nº.2: 101-117.

Câmara Municipal de Almada (CMAA). [internet]. Almada num minuto. [acedido a 24 de julho de 2020]. http://www.m-almada.pt/xportal/xmain?xpid=cmav2&xpgid=genericPage&GenericContentPage_qry=BOUI=5771022&actualmenu=5770956.

Câmara Municipal de Palmela (CMP) [Internet] Anuário estatístico de Palmela - O retrato de um concelho em números. [acedido a 19 de agosto de 2020] https://www.cm-palmela.pt/cmpalmela/uploads/document/file/11705/anuario_estatistico_2017.pdf.

Câmara Municipal do Seixal (CMS). [Internet]. [acedido a 19 de agosto de 2020]. <https://www.cm-seixal.pt/territorio>.

Can H, Döşkaya M, Özdemir HG, EA Şahar, Karakavuk M, Pektaş B, Karakuş M, Töz S, Caner A, Döşkaya AD, İz SG, Özbel Y, Gürüz Y. Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey. 2016. *Experimental Parasitology*, 167: 109-114.

Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, Schallig H, Solano-Gallego L. 2010. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Veterinary Parasitology* 174, 37-42.

Cardoso L, Schallig HDFH, Neto F, Kroon N, Rodrigues M. 2004. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Tropica*. Vol. 91: 95-100.

Costa-Durão, J.F., Rebelo, E., Peleteiro, M.C., Correia, J.J., & Simões, G. (1994). Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (concelho de Semsimbra). Nota preliminar. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 89 (551), 140 – 144.

Díaz-Regañón D, Villaescusa A, Ayllón T, Rodríguez-Franco F, Baneth G, Calleja-Bueno L, García-Sancho M, Agulla B, Sainz A. 2017. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. and *Cytauxzoon* sp. in domestic and stray cats from Madrid, Spain. *Parasites and Vectors*. 10:112.

Duarte A, Castro I, Pereira da Fonseca IM, Almeida V, Madeira de Carvalho LM, Meireles J, Fazendeiro MI, Tavares L, Vaz Y. 2010. Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. *Journal of feline Medicine and Surgery* 12, 441-446.

Duarte A, Marques V, Correia JHD, Neto I, Bráz BS, Rodrigues C, Martins T, Rosado R, Ferreira JP, Santos-Reis M, tavares L. 2014. Molecular detection of haemotropic *Mycoplasma* Species in urban and rural cats from Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*: 1-7.

Ellis SLH, Rondan I, Carney HC, Heath S, Rochlitz I, Shearburn LD, Sundahl E, Westropp JL. 2013. AAEP and ISFM Feline Environmental Needs Guidelines. *Journal Feline Medicine and Surgery*, 15 219-230.

Giannelli A, Latrofa MS, Nachum-Biala Y, Hodžić A, Greco G, Attanasi A, Annoscia G, Otranto D, Baneth G. 2017. Three different *Hepatozoon* species in domestic cats from southern Italy. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8: 721-724.

Gomes P. 2015. Detecção da infeção por *Leishmania* spp., em gatos da área Metropolitana de Lisboa, através de técnicas de diagnóstico Serológico (IFI e ELISA) e de uma técnica molecular (qpcr) aplicada a células conjuntivais e a sangue. [Dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina de Veterinária-Universidade de Lisboa. p.28-105.

González E, Jiménez M, Hernández S, Martín-Martín I, Molina R. 2017. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasites & Vectors* 10, 368. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2309-z>.

Hartmann K, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H et al. 2013. Babesiosis in cats- ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15: 643-646.

Instituto Nacional de Estatística.[Internet].Território e população-Retrato de Almada segundo os Censos 2011. [acedido a 24 de julho de 2020]. https://www.m-almada.pt/ngt_server_acd/attachfileu.jsp?look_parentBoui=225652153&att_display=n&att_download=y.

Jones S, Graham W, Simson C, Stannard R, Carithers D, Payne P, Rehm C, Nelson CT, Smith-Blackmore M, Clyde E, et al. 2014. Current feline guidelines for the prevention, diagnosis, and management of Heartworm(*Dirofilaria immitis*) infection in cats. American Heartworm Society. Wilmington, DE.

Kegler K, Nufer U, Alic A, Posthaus H, Olias P, Basso W. 2018. Fatal infection with emerging apicomplexan parasite *Hepatozoon silvestris* in a domestic cat. *Parasites & Vectors*, 11:428.

Lappin MR, Miller W, Sellins D. 2012. Effect of doxycycline or orbifloxacin administration on *Bartonella* spp. and Hemoplasma assay results in naturally exposed cats. *Intern Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*; 10: 225–233.

Lappin MR, Tasker S, Roura X. 2020a. Role of vector-borne pathogens in the development of fever in cats – 1. Flea associated diseases. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 22, 31-39.

Lappin MR, Tasker S, Roura X. 2020b. Role of vector-borne pathogens in the development of fever in cats - 2. Tick and sandfly associated diseases. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 22, 41–48.

Leal RO, Pereira H, Cartaxeiro C, Delgado E, Peleteiro MC, Pereira da Fonseca I. 2018. Granulomatous rhinitis secondary to feline leishmaniosis: report of an unusual presentation and therapeutic complications. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*. 1-7.

Leiva M, Lloret A, Peña T, Roura X. 2005. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Veterinary Ophthalmology* 8, 1, 71-75.

Leishvet: Leishmaniose canina e Felina - Informação concisa para o médico veterinário. (Leishvet).2018. [internet]. [acedido a 3 de julho de 2020]. <http://www.leishvet.org/wp-content/uploads/2018/09/PO-Guidelines.pdf>.

Lloret A, Addie DD, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Horzinek MC, Hosie MJ, Lutz H, et al. 2015. Hepatozoonosis in cats- ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 17: 642-644.

Maia C, Gomes J, Cristóvão J, et al. 2010. Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region. Portugal. *Veterinary Parasitology*. 174: 336–340.

Maia C, Nunes M, Campino L. 2008. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 8: 555-9.

Maia C, Pimenta P, Cardoso L. 2015. Feline leishmaniosis in Portugal- some remark on disease and infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Vol 17: 1081-1082.

Maia C, Ramos C, Coimbra M, Bastos F, Martins A, Pinto P, Nunes M, Vieira ML, Cardoso L, Campino L. 2015. Prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen and antibodies to *Leishmania infantum* in cats from southern Portugal. *Parasitology International*, 154-156.

Maia C, Ramos C, Coimbra M, Cardoso L, Campino L. 2014. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasites and Vectors*, 7:115.

- Maia C, Sousa C, Ramos C, Cristóvão JM, Faisca P, Campino L. 2015. First case of feline leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* genotype E in a cat with a concurrent nasal squamous cell carcinoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*.1-5.
- Marcondes M, Hirata KY, Vides JP, Sobrinho LSV, Azevedo JS, Vieira TSWJ, Vieira RFC. 2018. Infection by *Mycoplasma spp.*, feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats from an area endemic for visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors* , Short Report: 11:131.
- Marques CS, Santos MF, Pomba C, Gomes L, Duarte A, Meireles J, Tavares L, Santos-Gomes G, Pereira da Fonseca I. 2013. Detection of *Leishmania* infection in cats by qPCR of blood and conjunctival swabs and by indirect immunofluorescence assay [Abstract]. In *Proceedings of the 5th World Leish Congress, Porto de Galinhas, Brazil, 13 – 17 May*, p. 242.
- Martínez-Díaz VL, Silvestre-Ferreira AC, Vilhena H, Pastor J, Francino O, Altet L. 2013. Prevalence and co-infection of *haemotropic mycoplasmas* in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. *Journal of feline Medicine and Surgery*, 15:879-85.
- Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-pPérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. 2007. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145: 267-73.
- Meireles J, Paulos F, Serrão I. 2014. *Dirofilariose canina e felina*. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 109 (591-592) 70-78.
- Miró G, Rupérez C, Checa R, Gálvez R, Hernández L, García M, Canorea I, Marino V, Montoya A. 2014. Current status of *L. Infantum* in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for recent outbreak of human leishmaniosis?. *Parasites and Vectors*, 7:112.
- Morganti G, Veronesi F, Stefanetti V, Muccio T, Fiorentino E, Diaferia M, Santoro A, Passamonti F, Gramiccia M. 2019. Emerging feline vector-borne pathogens in Italy. Morganti et al. *Parasites & Vectors*, Short Report: 12:193.
- National Geographic [Internet]. 2017. Casey Smith. [acedido a 18 de julho de 2020]. <https://www.nationalgeographic.com/news/2017/06/domesticated-cats-dna-genetics-pets-science/>.
- Navarro J, Sánchez J, Penafiel-Verdú C, Buendia A, Altimira J, Vilafranca,M. 2010. Histopathological Lesions in 15 cats with Leishmaniose. *Journal of Comparative Pathology*, 143: 297-302.
- Neves M, Lopes AP, Martins C, Fino R, Paixão C, Damil L, Lima C, Alho AM, Schalling HDFH, Dubey JP, Cardoso L.2020. Survey of *Dirofilaria immitis* antigen and antibodies to *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in cats from Madeira Island, Portugal. *Parasites & Vectors*, Short Report, 13:117.
- Nentwig A, Meli ML, Schrack J, Reichler IM, Riond B, Gloor C, Howard J, Hofmann-Lehmann R, Willi B. 2018. First report of *Cytauxzoon* sp. infection in domestic cats in Switzerland: natural and transfusion- transmitted infections. *Parasites & Vectors*. Short report, 11:292.
- Otranto D, Napoli E, Latrofa MS, Annoscia G, Tarallo VD, Greco G, Lorusso E, Gulotta L, Falsone L, Bassano FS, Pennisi MG. 2017. Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: Pathogen and vector circulation in a confined environment. *Veterinary Parasitology*, 236: 144-151.
- Pennisi MG. 2002. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In R. Killick-Kendrick (Ed.), *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum: Canine Leishmaniasis: moving towards a solution*. Sevilla, Spain. p. 39-48.

- Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, Oliva G, Solano-Gallego L. 2015a. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & Vectors*: 1-18.
- Pennisi MG, Hartmann K, Lloret A, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hosie MJ, et al. 2013. Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15, 638–642.
- Pennisi MG, Hartmann K, Addie DD, Lutz H, Gruffydd-Jones T, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Horzinek MC, Hosie MJ, Lloret A, Marsilio F, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Möstl K. European Advisory Board on Cat Diseases, 2015b. Blood transfusion in cats: ABCD guidelines for minimising risks of infectious iatrogenic complications. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 17, 588–593. <http://dx.doi.org/10.1177/1098612x15588449>.
- Pennisi MG. 2015. Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. *Veterinary & Parasitology* 208, 35–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.023>.
- Pennisi MG, Persichetti MF. 2018. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog. *Veterinary Parasitology* 251, Research paper: 131-137.
- Pennisi MG, Tasker S, Hartmann K, Belák S, Addie D, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Hofmann-Lehmann R, Hosie M, et al. 2020. Dirofilarioses in cats- European guidelines from the ABCD on prevention and management. *Journal of Medicine and Surgery*. 22, 442-451.
- Pereira MA. 2008. Capítulo III: Epidemiologia da leishmaniose canina. In Santos-Gomes GM, Pereira da Fonseca, I, editores. *Leishmaniose canina*. 1ª edição. Lisboa: Chaves; p. 41-51.
- Pereira da Fonseca I, Saraiva-Marques C, Basso A, Garrido J. 2013. Leishmaniose felina: *Revista AEFMV*, nº 67: 15-25.
- Persichetti MF, Solano-Gallego L, Serrano L, Altet L, Reale S, Masucci M, Pennisi MG. 2016. Detection of vector-borne pathogens in cats and their ectoparasites in southern Italy. *Parasites & Vectors* 9, 247. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1534-1>.
- Persichetti MF, Solano-Gallego L, Vullo A, Masucci M, Marty P, Delaunay P, Vitale F, Pennisi MG. 2017. Diagnostic performance of ELISA, IFAT and Western blot for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in cats using a Bayesian analysis without a gold standard. *Parasites & Vectors*: 1-8.
- Petrie A, Watson P. 2013. *Statistics for Veterinary and Animal Science*. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell. p 75-83.
- Pinto P. 2013. Prevalência da infeção por *Leishmania* sp. em gatos residentes no concelho de Cascais. [Dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. p.14-72.
- Pimenta P, Alves-Pimenta S, Barros J, Barbosa P, Rodrigues A, Pereira MJ, Martez L, Gama A, Cristóvão JM, Campino L, Maia C, Cardoso L. 2015. Feline leishmaniosis in Portugal: 3 cases (year 2014). *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*: 65-69.
- Pires L. 2016. Estudo da infeção por *Leishmania* spp. numa colónia de gatos errantes da Ilha de Faro. [Dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. p.18-58.
- Priolo V, Martínez-Orellana P, Pennisi MG, Masucci M, Prandi D, Ippolito D, Bruno F, Castelli G, Solano-Gallego L. 2019. *Leishmania infantum* - specific IFN- γ production in stimulated blood from cats living in áreas where canine leishmaniosis is endemic. *Parasites & Vectors*: 12:133.

- Reichard MV, Rugg JJ, Thomas JE, Allen KE, Barret AW, Murray JK, Herrin BH, Beam RA, King VL, Vatta AF. 2019. Efficacy of a topical formulation of selamectin plus sarolaner against induced infestations of *Amblyomma americanum* on cats and prevention of *Cytauxzoon felis* transmission. *Veterinary Parasitology*, 270: S31-S37.
- Rosa N. 2009. Rastreo de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da área metropolitana de Lisboa [Dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade de Lisboa. p.20-104.
- Silaghi C, Knaus M, Rapti D, Kusi I, Shukullari E, Hamel D, Pfiser K, Rehbein S. 2014. Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, haemotropic mycoplasmas and other arthropod-borne pathogens in cats from Albania. *Parasites & Vectors*, 7:62.
- Soares, CSA. 2014. Feline Leishmaniasis: A Review. [Dissertação de mestrado] Coimbra: Escola Universitária Vasco da Gama- Medicina Veterinária. p. 11-31.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso, L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 165: 1–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>.
- Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada Y, Portús M, Alberola J. 2007. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean. *American Journal Tropical of Medicine and Hygiene*, 76: 676–680.
- Spada E, Perego R, Vitale F, Bruno F, Castelli G, Tarantola G, Baggiani L, Magistrelli S, Proverbio D. 2020. Feline *Leishmania* spp. infection in a non-endemic area of Northern Italy. *Animals* ,10:817. doi:10.3390/ani10050817.
- Sparkes AH, Bessant C, Cope K, Ellis SLH, Finka L, Halls V, Hiestand K, Horsford K, Laurence C, MacFarlane I, Neville PF, Stavisky, Yates J. 2013. ISFM Guidelines on population management and welfare of unowned domestic cats (*Felis catus*). *Journal Feline Medicine and Surgery*,15: 811-817.
- Sykes JE. 2010. Feline Hemotropic Mycoplasmas. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1), 62–69.
- Tabar MD, Altet L, Francino O, Sánchez A, Ferrer L, Roura X. 2008. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona área (Spain). *Veterinary Parasitology*, 151: 332-336.
- Tasker S, Caney SM, Day MJ, Dean RS, Helps CR, Knowles TG, Lait PJP, Pinches MDG, Gruffydd-Jones TJ. 2006. Effect of chronic FIV infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on *Mycoplasma haemofelis* infection. *Veterinary Microbiology*; 117: 169–179.
- Tasker, S. 2010. Haemotropic Mycoplasmas: What's their real significance in cats? *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12(5), 369–381.
- Tasker S, Hofmann-Lehmann R, Belák S, Frymus T, Addie D, Pennisi MG, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Marsilio F, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Möstl, K. 2018. Haemoplasmosis in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*; 20: 256–261.
- Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW. 2012. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* 2nd ed. Iowa: Wiley-Blackwell. p 94-96.
- Thrusfield M, Christley R. 2018. *Veterinary Epidemiology* 4th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell. p 323-324.

Tomás AM, Romão FS. 2008. Capítulo I: Biologia do parasita. In Santos-Gomes GM, Pereira da Fonseca, I, editores. Leishmaniose canina. 1ª edição. Lisboa: Chaves; p. 8-23.

WHO [Internet]. 2020. [acedido a 16 de agosto de 2020]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

ANEXOS

ANEXO 1 - Questionário a ser preenchido pelos tutores dos gatos em estudo.



Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade de Lisboa



Questionário para Dissertação de Mestrado

Estágio MIMV Catarina Isabel Lopes Sequeira- Hospital Veterinário Principal Dra. Cristina Alves

Este questionário de **apenas 3 minutos** deve ser preenchido por tutores de gatos de qualquer idade ou sexo no âmbito do tema “Leishmaniose em Gatos no concelho de Almada”.

Data da recolha da amostra _____

Nº. da amostra: _____

1. Informações do Responsável pelo animal

1.1.

1.1.1. Tutor do animal ☐

1.1.2. Pertence a uma instituição ☐

1.1.3. Outro ☐ Qual? _____

1.2. Idade: _____

1.3. Sexo: Masculino ☐ Feminino ☐

1.4. Ocupação profissional: _____

1.5. Concelho/ Local onde habita: _____

1.6. Vive em:

1.6.1. Meio Urbano ☐

1.6.2. Meio Rural ☐

1.6.3. Misto ☐

1.7. Relativamente a aves:

1.7.1. Tem ou existem galinhas ou outras aves perto da habitação?

Sim ☐ Não ☐

Existem outras aves?

Sim ☐ Não ☐

Se sim qual/quais? _____

1.8. A casa onde habita tem:

- 1.8.1. Varanda ☐
- 1.8.2. Terraço ☐
- 1.8.3. Quintal ☐
- 1.8.4. Terreno ☐
- 1.8.5. Não tem espaço exterior ☐

1.9. Perto da habitação existe:

- 1.9.1. Muros com fendas ☐
- 1.9.2. Águas paradas ☐
- 1.9.3. Caixotes do lixo ☐
- 1.9.4. Material vegetal em decomposição (p. ex. recolha de folhas caídas) ☐

1.10. No espaço exterior tem vegetação? Sim ☐ Não ☐

1.10.1. Se sim, qual /quais? _____

2. Informações Gerais sobre o Gato

2.1. Que idade tem o seu gato? _____

2.2. Sexo: Fêmea ☐ Macho ☐ Inteira(o) ☐ Castrada(o) ☐

2.3. É a primeira vez que tem um gato? Sim ☐ Não ☐

2.4. Raça: _____

2.5. Há quanto tempo o tem? _____

2.6. Caso tenha mais gatos em casa, quantos tem? _____

2.6.1.1. Se sim, algum está doente? Sim ☐ Não ☐

2.6.1.2. Qual a doença? _____

2.7. O seu gato tem acesso à rua? Sim ☐ Não ☐

2.7.1. Se sim, em que alturas do dia? Manhã ☐ Tarde ☐ Noite ☐ Outro: _____

2.8. Tem mais alguma espécie animal em casa? Sim ☐ Não ☐

2.8.1. Se sim, qual/quais? _____

3. Informações sobre a saúde do Gato

3.1. Índice corporal do gato? (Numa escala impar de 1 a 9 sendo 1 muito magro e 9 obeso)

- 3.1.1. 1 ☐
- 3.1.2. 3 ☐
- 3.1.3. 5 ☐
- 3.1.4. 7 ☐
- 3.1.5. 9 ☐

3.2. Com que frequência leva o seu gato/os ao veterinário?

Primeira vez ☐ Menos que 3 vezes por ano ☐ Mais que 3 vezes por ano ☐
Quando está doente ☐

- 3.3. O seu gato tem algum problema de saúde? Sim ☐ Não ☐
3.3.1. Se sim, qual/quais? _____
3.3.2. Quando surgiu? _____

- 3.4. Toma medicação? Sim ☐ Não ☐
3.4.1. Se sim, qual/quais? _____

- 3.5. Administra desparasitação externa? Sim ☐ Não ☐
3.5.1.1. Se sim qual? _____
3.5.1.2. Com que frequência?
3.5.1.2.1. Mensal ☐
3.5.1.2.2. 6 em 6 meses ☐
3.5.1.2.3. Anual ☐
3.5.1.2.4. Outra: _____

- 3.6. Administra desparasitação interna? Sim ☐ Não ☐
3.6.1. Se sim, qual? _____
3.6.2. Com que frequência?
3.6.2.1.1. Mensal ☐
3.6.2.1.2. 6 em 6 meses ☐
3.6.2.1.3. Anual ☐
3.6.2.1.4. Outra: _____

- 3.7. O seu gato tem a vacinação atualizada? Sim ☐ Não ☐
3.7.1. Se sim qual/quais?
3.7.1.1. Panleucopénia felina ☐
3.7.1.2. Calicivirus ☐
3.7.1.3. Hespesvírus ☐
3.7.1.4. FeLV ☐

- 3.8. O seu gato já foi testado para FIV e FeLV? Sim ☐ Não ☐
3.8.1. Se sim, qual o resultado?
3.8.1.1. Positivo a FeLV ☐
3.8.1.2. Positivo a FIV ☐
3.8.1.3. Negativo a ambos ☐
3.8.1.4. Positivo a ambos ☐

4. Aconselhamento e Informação fornecida ao proprietário sobre Leishmaniose em Gatos

- 4.1. Conhece a doença Leishmaniose? Sim ☐ Não ☐
4.1.1. Sabe como se transmite a doença? Sim ☐ Não ☐
4.2. Tem algum cão com esta doença? Sim ☐ Não ☐
4.3. Sabia que os gatos podem ter esta doença? Sim ☐ Não ☐

4.4. Quando foi com o seu gato a uma consulta, alguma vez foi informado/a relativamente à Leishmaniose em gatos? Sim ☐ Não ☐

4.4.1. Foi informado/a sobre a prevenção e quando a fazer? Sim ☐ Não ☐

4.5. O seu gato já fez alguma vez o diagnóstico para a infeção por *Leishmania*/ Leishmaniose? Sim ☐ Não ☐

4.5.1. O seu gato tem Leishmaniose diagnosticada? Sim ☐ Não ☐

4.6. Usa meio de prevenção da doença, nomeadamente, coleira da Seresto®? Sim ☐ Não ☐

4.7. Para além deste gato, tem algum gato em casa com Leishmaniose? Sim ☐ Não ☐

4.8. O seu gato apresenta:

4.8.1. Descamação cutânea ☐

4.8.2. Eritema ☐

4.8.3. Falta de pêlo na região da cabeça e/ou pescoço ☐

4.8.4. Feridas de difícil cicatrização ☐

4.8.5. Nódulos ☐

4.8.6. Emagrecimento sem causa aparente ☐

4.8.7. Nenhum destes sinais ☐

4.8.8. Outros: _____

Obrigada pela colaboração!

Catarina Sequeira



ANEXO 2 - Autorização para a colheita de sangue nos gatos presentes no estudo.

Autorização para colheita da amostra de sangue no âmbito da Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária “Infeção por *Leishmania*/Leishmaniose em Gatos no concelho de Almada”

Eu, _____ tutor/cuidador do
(a) _____, nascido (a) em _____ autorizo que seja colhida uma amostra de sangue no âmbito do trabalho de investigação destinado à elaboração da Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária “Infeção por *Leishmania*/Leishmaniose em Gatos no Concelho de Almada” da estudante Catarina Sequeira

Data

Assinatura do Tutor/Cuidador

ANEXO 3 - Tabela com os resultados obtidos através da Técnica de IFI (com limiares de positividade nas diluições de 1:40 e 1:80) destinada à detecção de anticorpos anti-*Leishmania*.

GATO N.º	1	2	3	4	5	6	8	10	11
IFI 1/40	P	N	N	N	P	N	N	N	P(-)
IFI 1/80	P	N	N	N	N	N	N	N	N

GATO N.º	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
IFI 1/40	P(-)	N	P	P	P(--)	P	P	P(--)	N	N
IFI 1/80	P	N	P	P	N	P	P	N	N	N

GATO N.º	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
IFI 1/40	N	N	N	N	P	P	N	P	N	N
IFI 1/80	P	N	N	N	P	N	N	P	N	N

GATO N.º	32	33	34	35	36
IFI 1/40	P(-)	P(-)	P	P	N
IFI 1/80	N	N	P	P	N

*P(-)- Positivo fraco

**P(--)- Positivo muito fraco

ANEXO 4 - Tabela com resultados da presença de *Mycoplasma* por observação dos esfregaços de sangue.

GATO N.º	1	2	3	4	5	6	8	10	11
<i>Mycoplasma</i>	N	N	N	N	N	N	P	P	P

GATO N.º	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
<i>Mycoplasma</i>	P	P	P	P	P	N	P	P	N	P

GATO N.º	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
<i>Mycoplasma</i>	P	N	P	P	P	P	P	N	N	N

GATO N.º	32	33	34	35	36
<i>Mycoplasma</i>	P	P	P	P	P

ANEXO 5 - História pregressa dos gatos presentes no estudo.

GATO Nº	(1/40)	(1/80)	Pelagem	História pregressa
1	P	P (-)	Comprida branca (persa)	21/11/2019- Diarreia esporadicamente e recorrente.
2	N	N		17/09/2019- Vômitos, Perda de Peso, Desidratação. 05/12/2019- Desidratação, inapetência. 17/06/2020- Inapetência, vômitos e diarreia. À auscultação detetou-se um sopro cardíaco.
3	N	N		18/04/2019- Espirros com epistáxis. Narina esquerda obstruída. 27/11/2019- Creatinina muito elevada. Desidratação. 04/12/2019- Valores mais baixos de creatinina (6.4) BUN 78. 07/12/2019- Úlcera na pele no maxilar inferior. 08/12/2019- Inapetência. 01/03/2019- Eutanásia.
4	N	N		02/12/2019- Vacinação em atraso, vive com outra gata. Há 3 dias que se encontra prostrado e não come. Perda de peso progressiva. EEG: mucosas pálidas, anemia macrocítica, normocrômica, HCT 12%. Nas análises bioquímicas: aumento de FAS e ALT. Eutanásia.
5	P	N		s/ registo de doenças.

6	N	N	Tigrado	20/11/2019- Gata jovem, adotada. Logo após à adoção, começou com diarreia. Realizou tratamento sintomático. Após conclusão do tratamento, as fezes normalizaram.
8	N	N		s/ registo.
10	N	N	Preta	PIF. FeIV. Eutanásia.
11	P (-)	N		11/01/2020- Disúria. Obstrução das vias urinárias. 13/01/2020-Melhorou, mas desde ontem apresenta hematúria após um episódio de stress. A consistência das fezes e a frequência de defecação normalizou com a ração. 19/01/2020- Resultado cultura de urina: <i>Proteus mirabilis</i> . Poliaquiúria.
12	P (-)	P	Preta e branca	s/ registo.
13	N	N		s/ registo.
14	P	P		s/ registo.
15	P	P (-)	Tigrada e branca	12/02/2020- Fezes moles com hematoquézia e melena, vômito c/ sangue (hematemese). Creatinina elevada. 16/02/2020- Ambos os rins com alterações de conformação e zonas hipoeogénicas na cortical.
16	P (--)	N		s/ registo.
17	P	P (-)	Preto e Branco	20/02/2020- Bilirrubina e creatinina elevadas. Perda de peso. Soro icterico. 21/02/2020- Vômito e inapetência.
18	P	P	Cinzento (bosque norueguês)	29/07/2019- PP. Diarreia, desidratação, apresenta à palpação abdominal ansas intestinais com espessura aumentada. Hiperglicémia. Diagnosticado com Hiperadrenocorticismismo. 28/08/2020- Hematoquézia.

				<p>18/09/2019- Diarreia há uma semana. Choque hipoglicémico. Hipotermia. Ionograma: hiponatrémia.</p> <p>27/10/2019- Hematoquézia.</p> <p>14/03/2020- Há 3 dias com PU/PD e diarreia. HTC diminuído, hiperglicemia, hipoalbuminémia, ALP aumentada, GPT e BUN aumentadas.</p> <p>30/03/2020- Prostrado, vômitos, diarreia, poliaquiúria. Dificuldade em movimentar-se.</p> <p>31/03/2020- Glicémia não controlada. Glicosúria, Densidade urinária baixa 1.022.</p>
19	P (--)	N		24/02/2020- Gato com tutor mas só com acesso ao exterior, prolapso no olho esquerdo. Pulgas. Realizou-se cirurgia para enucleação do globo ocular esquerdo.
20	N	N	Branco e preto	05/03/2020- Orquiectomia.
21	N	N	Branca	23/06/2020 -OVH.
22	P	P (-)	Tigrada	OVH.
23	N	N	Preto	30/11/2019- Perda de peso progressiva. Leucopénia, Positivo a FIV.
24	N	N	Preto	01/03/2020- Claudicação do MAE. Pulgas.
25	N	N		s/ registo
26	P	P (-)	Preto	<p>11/02/2020-PP, vômito, apetite caprichoso.</p> <p>03/03/2020-Mudou a ração e voltou a vomitar.</p> <p>06/03/2020- Continua igual.</p>

27	P	N	Amarelo	<p>19/02/2019- Diarreia.</p> <p>15/03/2019- Diarreia.</p> <p>18/03/2019- Diarreia.</p> <p>10/07/2019- Tosse emetizante, prostrado. Hipertermia, Raio X torácico LLD, LLE e VD com padrão intersticial e brônquico na região dorsal principalmente do lado direito..</p> <p>11/07/2019- Passou a noite a vomitar. À Eco, na zona cranial, intestino muito inflamado.</p> <p>26/05/2020- Episódios de diarreia desde há 1 ano. Desde ontem, saliva mais espessa, hematoquêzia, fezes pastosas, ligeira distensão abdominal. Apetite diminuído. EEG: feridas nas narinas e ulceração na comissura labial, inflamação dos arcos palatinos, desconforto à palpação abdominal. Aumento da creatinina.</p>
28	N	N	Cinzenta	<p>11/01/2019- Falta de apetite.</p> <p>13/01/2019- Leucopénia.</p> <p>21/01/2019- Fezes moldadas com hematoquêzia.</p> <p>20/03/2019- Feridas circulares (possível mordida de cão?) no MPE.</p> <p>22/03/2019- Abcesso no glúteo esquerdo.</p>
	P	P	Cinza e branco	s/ registo de doenças.
30	N	N	Bege	s/ registo de doenças.
31	N	N	Preto	13/05/2019- Fístula da glândula perianal.
32	P (-)	N		s/ registo
33	P (-)	N		<p>07/03/2020- Deixou de comer, gengivite na mandíbula direita.</p> <p>15/03/2020- Coriza.</p>

				18/03/2020- TAC: neoplasia na mandibula, metástases no pulmão
34	P	P (-)	Castanha	16/02/2020- PU/PD. <i>Diabetes mellitus</i>
35	P	P (-)	Tigrada	12/05/2020- PP.
36	N	N	Tigrado malhado	05/01/2020- Ferida no pescoço.

ANEXO 6 - Dados recolhidos através do inquérito realizado aos tutores/cuidadores.

						Informação tutor										
	Responsável pelo animal	Idade		Sexo		Ocupação	Local da habitação		Meio onde vive		Aves		Casa c/ espaço exterior		Perto de casa existe	Vegetação no exterior
	Tutor do animal	menos de 25 Anos	2	Feminino	29		Charneca da caparica	8	urbano	12	sim, galinhas	2	varanda	4	Muros com fendas	sim, arbustos
	Instituição	25-35 Anos	6	Masculino	5		Almada	12	rural	4	sim galinhas e outras aves	3	terraço	1	Águas paradas	sim, árvores de fruto
		36-45 Anos	10				Sobreda da Caparica	4	misto	18	sim outras aves	14	quintal	17	Caixotes do lixo	sim, árvores
		46-55 Anos	3				Costa da caparica	2			não	15	terreno	9	Material vegetal em decomposição	sim, flores
		56-65 Anos	6				Feijó	1					não tem	3	Todos	não
		mais de 66 Anos	7				Vila Nova da Caparica	1							Muros com fendas e lixo	sim, todos
							Pinhal Novo	1								
							Seixal	4								
Gato Nº	Responsável pelo animal	Idade		Sexo		Ocupação	Local da habitação		Meio onde vive		Aves		Casa c/ espaço exterior		Perto de casa existe	Vegetação no exterior
1	Tutor do animal	56-65 Anos		Feminino		Veterinária	Charneca da caparica		rural		sim galinhas e outras aves		terreno		muros com fendas e lixo	sim, árvores
2	Tutor do animal	46-55 Anos		Feminino		Eng. Industrial	Costa da caparica		urbano		sim outras aves		quintal		Caixotes do lixo	sim, flores
3	Tutor do animal	36-45 Anos		Feminino		Assistente Call center	Almada		urbano		não		não tem		Caixotes do lixo	não
4	Tutor do animal	25-35 Anos		Feminino		Assistente Comercial	Sobreda da Caparica		misto		não		quintal		Muros com fendas e lixo	sim, arbustos
5	Tutor do animal	mais de 66 Anos		Feminino		Reformada	Charneca da caparica		rural		sim galinhas e outras aves		quintal		Muros com fendas e lixo	sim, árvores de fruto
6	Tutor do animal	46-55 Anos		Feminino		Desempregada	Sobreda da Caparica		rural		sim outras aves		quintal		Muros com fendas e lixo	sim, árvores
8	Tutor do animal	36-45 Anos		Feminino		Dentista	Charneca da caparica		misto		não		terreno		Todos	sim, árvores de fruto
10	Tutor do animal	56-65 Anos		Feminino		Massagista	Charneca da caparica		misto		não		terreno		Todos	sim, árvores
11	Tutor do animal	mais de 66 Anos		Feminino		Reformada	Feijó		misto		sim, galinhas		não tem		Todos	sim, arbustos
12	Tutor do animal	25-35 Anos		Masculino		Farmacêutico	Almada		misto		não		terreno		Caixotes do lixo	sim, árvores
13	Tutor do animal	36-45 Anos		Feminino		Chefe de cabine	Vila Nova da Caparica		misto		sim, galinhas		terreno		Todos	sim, árvores
14	Tutor do animal	mais de 66 Anos		Feminino		Reformada	Costa da caparica		urbano		sim outras aves		quintal		Muros com fendas	sim, árvores
15	Tutor do animal	mais de 66 Anos		Feminino		Reformada	Pinhal Novo		rural		sim galinhas e outras aves		terreno		Todos	sim, todos
16	Tutor do animal	mais de 66 Anos		Feminino		Reformada	Costa da caparica		urbano		sim outras aves		não tem		Muros com fendas e lixo	sim, árvores
17	Tutor do animal	menos de 25 Anos		Feminino		Aux Veterinária	Almada		misto		não		quintal		Todos	sim, árvores de fruto
18	Tutor do animal	25-35 Anos		Feminino		Recursos Humanos	Almada		misto		não		quintal		Muros com fendas	sim, árvores
19	Tutor do animal	56-65 Anos		Feminino		Assistente operacional	Charneca da caparica		urbano		não		quintal		Todos	sim, todos
20	Tutor do animal	56-65 Anos		Feminino		Docente	Almada		misto		sim outras aves		terreno		Caixotes do lixo	sim, todos
21	Tutor do animal	56-65 Anos		Feminino		Docente	Almada		misto		sim outras aves		terreno		Caixotes do lixo	sim, todos
22	Tutor do animal	36-45 Anos		Feminino			Almada		urbano		não		quintal		Muros com fendas	sim, árvores
23	Tutor do animal	36-45 Anos		Feminino		Aux Consultório	Seixal		misto		sim outras aves		quintal		Todos	sim, árvores
24	Tutor do animal	25-35 Anos		Masculino		Estudante	Almada		urbano		não		varanda		Caixotes do lixo	sim, árvores
25	Tutor do animal	36-45 Anos		Masculino		Eng Civil	Charneca da caparica		urbano		não		terreno		Muros com fendas	não
26	Tutor do animal	mais de 66 Anos		Feminino		Reformada	Charneca da caparica		urbano		não		varanda		Caixotes do lixo	não
27	Tutor do animal	36-45 Anos		Feminino		Aux Veterinária	Seixal		misto		sim outras aves		quintal			sim, árvores
28	Tutor do animal	mais de 66 Anos		Masculino		Reformado	Sobreda da Caparica		misto		não		quintal			sim, arbustos
29	Tutor do animal	46-55 Anos		Feminino		Consultora	Almada		urbano		não		terraço			sim, árvores
30	Tutor do animal	36-45 Anos		Feminino		Aux Veterinária	Seixal		misto		sim outras aves		quintal		Caixotes do lixo	sim, árvores
31	Tutor do animal	36-45 Anos		Feminino		Aux Veterinária	Seixal		misto		sim outras aves		quintal		Caixotes do lixo	sim, árvores
32	Tutor do animal	menos de 25 Anos		Feminino		Aux Veterinária	Almada		misto		sim outras aves		quintal		Todos	sim, arbustos
33	Tutor do animal	56-65 Anos		Feminino		Desempregada	Sobreda da Caparica		misto		não		quintal		Caixotes do lixo	sim, arbustos
34	Tutor do animal	36-45 Anos		Masculino		Comerciante	Charneca da caparica		misto		sim outras aves		quintal		Todos	sim, arbustos
35	Tutor do animal	25-35 Anos		Feminino		Docente	Almada		urbano		sim outras aves		varanda		Muros com fendas	sim, árvores
36	Tutor do animal	25-35 Anos		Feminino		Docente	Almada		urbano		sim outras aves		varanda		Muros com fendas	sim, árvores

Informações Gerais do Gato																						
	Idade		Sexo		1º Gato	Raça		Quanto tempo o tem		Mais gatos em casa		Quantos	Algum está doente?		Qual doença?	Acesso à rua		Altura do dia		outra espécie em casa		Quais
	gatinho	3	fêmea	14	sim	Persa	1	Desde pequeno	28	sim	22	1	sim	6		sim	23	manhã	2	sim	19	cão
	júnior	7	macho	20	não	Europeu comum	31	Já em adulto	6	não	12	2	não	16		não	11	tarde	0	não	15	
	adulto	12				Bosque Norueguês	1					3						noite	0			
	sénior	9				Siamês	1					4						Manhã e tarde	6			
	idoso	1										5						todo o dia	14			
	NS	2										6						Manhã e Noite	1			
												7										
Gato Nº	Idade		Sexo		1º Gato	Raça		Quanto tempo o tem		Mais gatos em casa		Quantos	Algum está doente?		Qual doença?	Acesso à rua		Altura do dia		Outra espécie em casa		Quais
1	adulto		fêmea		não	Persa		Desde pequeno		sim		2	não			sim		Manhã e tarde		sim		cão
2	sénior		fêmea		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		4	não			sim		todo o dia		sim		cão
3	sénior		fêmea		não	Europeu comum		Já em adulto		sim		4	sim			não				não		
4	adulto		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		1	não			não				não		
5	adulto		fêmea		sim	Europeu comum		Desde pequeno		sim		1	não			sim		Manhã e tarde		não		
6	gatinho		fêmea		sim	Europeu comum		Desde pequeno		não						sim		Manhã e tarde		sim		cão
8	júnior		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		4	não			sim		todo o dia		sim		cão
10	adulto		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		2	não			sim		todo o dia		sim		cão
11	sénior		macho		não	Europeu comum		Já em adulto		não						não				não		
12	gatinho		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		não						não				sim		cão
13	júnior		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		não						não				sim		cão
14	júnior		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		2	não			sim		todo o dia		não		
15	sénior		fêmea		não	Europeu comum		Já em adulto		sim		3	não			não				sim		cão
16	NS		macho		não	Europeu comum		Já em adulto		sim		4	não			sim		todo o dia		não		
17	adulto		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		4	sim		IRC e FIV	sim		Manhã e tarde		sim		cão
18	sénior		macho		não	Bosque Norueguês		Desde pequeno		sim		1	não			não				não		
19	NS		macho		não	Europeu comum		Já em adulto		não						sim		todo o dia		não		
20	júnior		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		6	não			sim		todo o dia		sim		cão
21	júnior		fêmea		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		6	não			sim		todo o dia		sim		cão
22	gatinho		fêmea		sim	Europeu comum		Desde pequeno		não						sim		manhã		sim		cão
23	adulto		macho		não	Europeu comum		Já em adulto		sim		3	não			sim		todo o dia		sim		cão
24	adulto		macho		sim	Europeu comum		Desde pequeno		não						não				não		
25	sénior		fêmea		não	Europeu comum		Desde pequeno		não						sim		Manhã e Noite		sim		cão
26	idoso		fêmea		não	Europeu comum		Desde pequeno		não						não				não		
27	adulto		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		4	sim		FIV	sim		todo o dia		sim		cão
28	adulto		fêmea		não	Europeu comum		Desde pequeno		não						sim		Manhã e tarde		não		
29	júnior		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		1	não			sim		todo o dia		não		
30	adulto		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		4	sim		FIV	sim		todo o dia		sim		cão
31	júnior		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		4	sim		FIV	sim		todo o dia		sim		cão
32	sénior		fêmea		não	Europeu comum		Desde pequeno		sim		4	sim		FIV e IRC	sim		Manhã e tarde		sim		cão
33	sénior		macho		não	Europeu comum		Desde pequeno		não						sim		todo o dia		não		
34	sénior		fêmea		sim	Europeu comum		Desde pequeno		não						sim		manhã		sim		cão
35	adulto		fêmea		sim	Europeu comum		Desde pequeno		sim		1	não			não				não		
36	adulto		macho		não	Siamês		Desde pequeno		sim		1	não			não				não		

Saúde do Gato																		
	Índice corporal	Frequência ida ao vet	Problema de saúde		Qual	Toma medicação	Castrado	Desparasitação externa		Qual	Frequência	Desparasitação interna	Qual	Frequência	Vacinação atualizada		Testado para fiv e felv	
	1	1ª vez	3	sim	14	sim	sim	sim	30	pipeta	mensal	sim		mensal	sim	9	sim, negativo ambos	14
	3	menos de 3x por ano	7	não	20	não	não	não	4	comprimido	6 em 6 meses	não		4 em 4 meses	não	25	sim, positivo fiv	1
	5	mais de 3x por ano	6							coleira	anual			anual			sim, positivo felv	1
	7	quando está doente	18								Quando precisa			3 em 3 meses			não	18
	9										3 em 3 meses			2 em 2 meses				
											2 em 2 meses			6 em 6 meses				
Gato Nº	Índice corporal	Frequência ida ao vet	Problema de saúde		Qual	Toma medicação	Castrado	Desparasitação externa		Qual	Frequência	Desparasitação interna	Qual	Frequência	Vacinação atualizada		Testado para fiv e felv	
1	5	mais de 3x por ano	sim		Anemia	sim	sim	sim		pipeta	Quando precisa	sim	milbactor	4 em 4 meses	não		não	
2	3	mais de 3x por ano	sim		Desidratação, Perda de Appetite	não	sim	sim		pipeta	anual	não			não		sim, negativo ambos	
3	3	quando está doente	sim		Insuf renal e tumores mamários	sim	não	sim		pipeta	6 em 6 meses	sim	drontal	4 em 4 meses	não		sim, negativo ambos	
4	3	quando está doente	sim		Perda de Peso, Perda de Appetite	não	sim	sim		pipeta	anual	sim		anual	não		sim, negativo ambos	
5	5	menos de 3x por ano	não			não	sim	sim		coleira	6 em 6 meses	sim	milprazon	4 em 4 meses	não		sim, negativo ambos	
6	5	menos de 3x por ano	não			não	não	sim		pipeta	mensal	sim		mensal	sim		sim, negativo ambos	
8	5	menos de 3x por ano	sim			não	sim	sim		pipeta	Quando precisa	sim		anual	não		não	
10	1	quando está doente	sim		Obstipação	não	sim	sim		pipeta	anual	sim		anual	não		sim, positivo felv	
11	5	quando está doente	sim		Insuf renal	não	sim	não				não			não		não	
12	5	menos de 3x por ano	não			não	sim	sim			3 em 3 meses	sim		4 em 4 meses	sim		não	
13	5	1ª vez	não			não	sim	sim		pipeta	Quando precisa	sim		anual	não		não	
14	5	mais de 3x por ano	não			não	sim	sim		pipeta	2 em 2 meses	sim		4 em 4 meses	sim		não	
15	3	quando está doente	sim		Hematoquézia, vômito c/ sangue	não	sim	sim		pipeta	mensal	sim		3 em 3 meses	não		não	
16	5	quando está doente	sim		Possível tumor	não	sim	sim		pipeta	2 em 2 meses	não			não		não	
17	7	quando está doente	não			não	sim	sim		pipeta	3 em 3 meses	sim	milbactor	4 em 4 meses	não		sim, negativo ambos	
18	5	mais de 3x por ano	sim		Diabetes	sim	não	sim		pipeta	6 em 6 meses	sim		4 em 4 meses	sim		sim, negativo ambos	
19	5	quando está doente	sim		Extração de olho	não	sim	sim		pipeta	mensal	não			não		não	
20	5	1ª vez	não			não	não	sim		comprimido	mensal	não			não		não	
21	5	1ª vez	não			não	não	sim		comprimido	mensal	não			não		não	
22	5	mais de 3x por ano	não			não	sim	sim			6 em 6 meses	sim	milprazon	2 em 2 meses	sim		não	
23	5	quando está doente	sim		I	não	sim	sim		comprimido	mensal	sim	milbactor	4 em 4 meses	não		sim, positivo fiv	
24	5	menos de 3x por ano	não			não	sim	sim		coleira	6 em 6 meses	não			não		não	
25	5	quando está doente	sim		Gastrite	sim	sim	não				não			não		não	
26	3	quando está doente	não			não	sim	sim			anual	não			não		sim, negativo ambos	
27	5	quando está doente	não			não	sim	sim		comprimido	mensal	sim	milbactor	4 em 4 meses	não		não	
28	7	quando está doente	não			não	sim	sim			2 em 2 meses	não			sim		sim, negativo ambos	
29	3	mais de 3x por ano	não			não	sim	sim		pipeta	6 em 6 meses	sim	milprazon	mensal	sim		sim, negativo ambos	
30	5	quando está doente	não			não	sim	sim		comprimido	mensal	sim	milbactor	4 em 4 meses	não		sim, negativo ambos	
31	7	quando está doente	não			não	sim	sim		comprimido	mensal	sim	milbactor	4 em 4 meses	não		não	
32	5	quando está doente	não			não	sim	sim		comprimido	mensal	sim	milprazon	4 em 4 meses	não		sim, negativo ambos	
33	5	quando está doente	não			não	sim	sim		pipeta	mensal	sim	milbactor	4 em 4 meses	não		sim, negativo ambos	
34	5	quando está doente	sim		Diabetes	sim	sim	sim			6 em 6 meses	sim		6 em 6 meses	não		não	
35	5	menos de 3x por ano	não			não	sim	não				sim	milbactor	4 em 4 meses	sim		sim, negativo ambos	
36	5	menos de 3x por ano	não			não	sim	não				sim	milbactor	4 em 4 meses	sim		não	

Informação sobre Leishmaniose																							
Conhece a doença		Sabia que os gatos podem ter		Sabia como se transmite		Tem algum cão com a doença		Alguma vez foi informado sobre a doença		Sabe como fazer a prevenção		Sabia que a coleira seresto é a única que previne		O gato já alguma fvez fez o teste		O seu gato tem Leishmaniose diagnosticada		Caso tenha outros gatos, algum tem Leishmaniose		Sinais Clínicos		Sinais Clínicos	
	sim	27	sim	13-4= 9	23	sim	1	sim	2	sim	2	sim	1	sim	0	sim	0	sim	sim	descamação	descamação	eritema	eritema
	não	7	não	21	11	não	32	não	32	não	32	não	33	não	34	não	34	não	não	seborreia	seborreia	seborreia	seborreia
																				falta de pêlo pescoço e cabeça	falta de pêlo pescoço e cabeça	falta de pêlo pescoço e cabeça	falta de pêlo pescoço e cabeça
																				feridas de difícil cicatrização	feridas de difícil cicatrização	feridas de difícil cicatrização	feridas de difícil cicatrização
																				nódulos	nódulos	nódulos	nódulos
																				emagrecimento sem causa aparente	emagrecimento sem causa aparente	emagrecimento sem causa aparente	emagrecimento sem causa aparente
																				nenhum	nenhum	nenhum	nenhum
Gato Nº	Conhece a doença	Sabia que os gatos podem ter	Sabia como se transmite	Tem algum cão com a doença	Alguma vez foi informado sobre a doença	Sabe como fazer a prevenção	Sabia que a coleira seresto é a única que previne	O gato já alguma fvez fez o teste	O seu gato tem Leishmaniose diagnosticada	Caso tenha outros gatos, algum tem Leishmaniose	Sinais Clínicos	Sinais Clínicos											
1	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim	não	não	não	nenhum												
2	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
3	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	seborreia	nódulos											
4	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	feridas de difícil cicatrização	emagrecimento sem causa aparente											
5	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
6	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
8	sim	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	nenhum												
10	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	seborreia	emagrecimento sem causa aparente											
11	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
12	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
13	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
14	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
15	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
16	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
17	sim	sim	sim	não	sim	sim	não	não	não	não	descamação												
18	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
19	sim	não	não	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
20	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
21	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
22	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
23	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
24	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
25	sim	não	não	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
26	sim	não	não	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
27	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
28	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
29	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
30	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
31	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
32	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
33	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
34	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	descamação												
35	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												
36	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	nenhum												